



T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KLİNİK *Pseudomonas aeruginosa*
İZOLATLARINDA ANTİBİYOTİK
DUYARLILIKLARININ, BİYOFİLM
ÜRETİMİNİN ve *QUORUM SENSİNG*
GENLERİNİN BELİRLENMESİ

Ali Hussein Bha Aldan ALTURKI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Ağustos-2023
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

ALI HUSSEIN BHA ALDAN ALTURKI tarafından hazırlanan “**Klinik *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarında Antibiyotik Duyarlılıklarının, Biyofilm Üretiminin ve Quorum Sensing Genlerinin Belirlenmesi** ” adlı tez çalışması 10/08/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan

Prof. Dr. Leyla AÇIK

Danışman

Prof. Dr. Emine ARSLAN

Üye

Doç. Dr. Mehtap AKIN

İmza

.....

.....

.....

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Ömer faruk YÜKSEL
FBE Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

İmza

Ali Hussein Bha Aldan ALTURKI

Tarih: 10/8/2023

ÖZET

YÜKSEK LİSANS

KLİNİK *Pseudomonas aeruginosa* İZOLATLARINDA ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARININ, BİYOFİLM ÜRETİMİNİN ve *QUORUM SENSİNG* GENLERİNİN BELİRLENMESİ

Ali Hussein Bha Aldan ALTURKI

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof.Dr. Emine ARSLAN

2023, 63 Sayfa

Jüri

Prof. Dr. Emine ARSLAN

Prof. Dr. Leyla AÇIK

Doç. Dr. Mehtap AKIN

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*), hastanede yatan bağıışıklığı baskılanmış hastalarda yüksek oranda mortalite ve morbiditeye neden olan en önemli fırsatçı patojenlerden biri olarak bilinmektedir. *Quorum Sensing* (QS) sisteminin biyofilm oluşumunda, olgunlaşma, dağılım aşamasında ve ilaç direncinde rolü olduğu belirlenmiştir. Günümüzde patojenin virölansının azaltılması ve etken ile konak arasındaki etkileşimin ortadan kaldırılması, enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde en umut verici tedavi yöntemlerinden biridir. Bu çalışmada, klinik *P. aeruginosa* izolatlarının antibiyotiklere karşı direncinin, biyofilm üretiminin, QS'in *lasI*, *lasR* virölans genlerinin varlığının ve direnç geni *gyrB*'nin belirlenmesinin ve aralarındaki ilişkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışma materyalini, Kerkük Hastanelerinde 7-70 yaş arası hastalardan izole edilen ve atık haldeki *Pseudomonas* spp izolatları oluşturmuştur. 125 klinik örnekten izole edilen bakteri suşları seçici besiyeri olan Setrimid agar'da büyütölüp VITEK-2 ile identifiye edilerek 50 izolat (1 yanık, 28 yara, 14 idrar, 4 kan, 2 balgam, 1 bronşiyal) *P. aeruginosa* olarak doğrulanmıştır. Daha sonra tesbit edilen suşların ELİSA sistemi kullanarak kantitatif biyofilm testi yapılmıştır. 50 atık bakterinin laboratuvar duyarlılık testleri sonuçlarına göre, en dirençli 30 *P. aeruginosa* izolatının farklı ve daha geniş antibiyotiklere duyarlılığı VITEK-2 otomatik sistemi kullanılarak araştırılmıştır. *lasI*, *lasR* ve *gyrB* genlerinin polimeraz zincir reaksiyonu (conventional PCR) ve Agaroz Jel Elektroforezi tekniğı ile varlığı tesbit edilmiştir. 47 adet *P. aeruginosa* izolatının kantatif ELİSA biyofilm test sonuçları % 2.2'sinin negatif, %97.8'nin pozitif olduğu görölmüştür. Ayrıca pozitif olan sonuçların %10.6'nın şiddetli, %23.4'nin orta şiddetli ve %63.8'nin zayıf şiddetli biyofilm ürettiğı gözlemlenmiştir. Vitek-2 duyarlılık testlerine göre çoklu ilaç direnci (MDR) içeren en dirençli *P. aeruginosa* izolatlarının QS genleri olan *lasR*, *lasI* genlerini %96,6 oranında bulundurduğu tesbit edilmiştir. Aynı zamanda direnç geni *gyrB*'nin %96.6 oranında varlığı gözlemlenmiştir. Bu *gyrB* ihtiva eden bakterilerin en çok florokinolonlar grubu olan ciprofloxacın, levofloksasin ve antibiyotiklere dirençli olduğu görölmüştür. Bu çalışma antibiyotiğı dirençli bakteriler ve QS sistemi ile biyofilm oluşturan suşların hızlı tesbiti ile etkili tedaviye sağladığı katkıyı göstermek açısından önem arz etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Biyofilm, *gyrB*, Klinik *P. aeruginosa*, PCR, QS genleri.

ABSTRACT

MS/ THESIS

DETERMINATION of ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY, BIOFILM PRODUCTION and QUORUM SENSING GENES in CLINICAL *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ISOLATES.

Ali Hussein Bha Aldan ALTURKI

Advisor: Prof.Dr. Emine ARSLAN

2023, 63 Pages

Jury

Prof.Dr. Emine ARSLAN

Prof.Dr. Leyla AÇIK

Doç.Dr. Mehtap AKIN

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) is known as one of the most important opportunistic pathogens that cause high rates of mortality and morbidity in hospitalized immunocompromised patients. *Quorum Sensing* (QS) system has been determined to have a role in biofilm formation, maturation, distribution stage and drug resistance. Today, reducing the virulence of the pathogen and eliminating the interaction between the agent and the host is one of the most promising treatment methods in the treatment of infectious diseases. In this study, it was aimed to determine the resistance of clinical *P. aeruginosa* isolates to antibiotics, biofilm production, the presence of QS *lasI*, *lasR* virulence genes, and the resistance gene *gyrB* and their relationships. The study material consisted of 125 clinical *Pseudomonas* spp isolates in waste form, isolated from patients aged 7-70 years in Kirkuk Hospitals. Bacterial strains isolated from 125 clinical specimens were grown on the selective medium Cetrimid agar and identified with VITEK-2, and 50 isolates (1 burn, 28 wounds, 14 urine, 4 blood, 2 sputum, 1 bronchial) were confirmed as *P. aeruginosa*. Then, quantitative biofilm test of the determined strains was performed using the ELISA system. According to the results of laboratory susceptibility tests of 50 waste bacteria, the susceptibility of the 30 most resistant *P. aeruginosa* isolates to different and wider antibiotics was investigated using the VITEK-2 automated system. The presence of *lasI*, *lasR* and *gyrB* genes was determined by polymerase chain reaction (conventional PCR) and Agarose Gel Electrophoresis technique. Quantitative ELISA biofilm test results of 47 *P. aeruginosa* isolates were found to be 2.2% negative and 97.8% positive. In addition, it was observed that 10.6% of the positive results produced severe, 23.4% moderate and 63.8% weak biofilms. According to Vitek-2 susceptibility tests, it was determined that the most resistant *P. aeruginosa* isolates containing multi drug resistance (MDR) contained *lasR* and *lasI* genes, which are QS genes, at a rate of 96.6%. At the same time, the presence of the resistance gene *gyrB* was observed in 96.6%. These *gyrB*-containing bacteria were found to be most resistant to fluoroquinolones, ciprofloxacin, levofloxacin, and antibiotics. This study is important in terms of showing the contribution it provides to effective treatment with the rapid detection of antibiotic-resistant bacteria and biofilm-forming strains with the QS system.

Keywords: Biofilm, Clinic *P. aeruginosa*, *gyrB*, PCR, QS genes.

ÖNSÖZ

Deneyim, bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren ve bilgilerini benden esirgemeyen, kıymetli danışman hocam Sayın Prof.Dr. EMİNE ARSLANA 'a derin teşekkürlerimi sunarım. Kıymetli vaktini ayırıp tez çalışmamın istatistik analizine yardımcı olduğu için Sayın Dr.Öğr.Üye. Neriman KARADAYI AKDAM hocama teşekkürlerimi sunarım. Her anımda yanımda bulunan ve zor şartlarda destekleri ile bana güç katan değerli aileme teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca Kerkük şehrin'deki Hastanelerde bulunan tüm mikrobiyoloji ünitesinde çalışanlara destekleri için teşekkürlerimi sunarım.

Ali Hussein Bha Aldan ALTURKI
KONYA-Ağustos- 2023

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
ŞEKİLLER.....	x
ÇİZELGELER.....	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. Bakterilerin Tarihçesi ve Sınıflandırılması	3
2.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nın Özellikleri	4
2.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Genomu	5
2.4. Epidemiyoloji	5
2.5. Patogenez ve Virülans Faktörleri.....	6
2.6. <i>P. aeruginosa</i> da Quorum Sensing Genleri ve Biyofilm oluşumu arasındaki ilişkiler.....	8
2.7. <i>P. aeruginosa</i> 'nın Antibiyotiklere Direnci	12
2.8. <i>P. aeruginosa</i> 'da Kromozomal DNA'nın mutasyonu ve <i>gyrB</i> geni	13
2.9. Yapılan Diğer Araştırmalar	13
3. MATERYAL VE YÖNTEM	16
3.1. Materyal	16
3.1.1. Bakteri izolatlarının toplanması ve muhafazası.....	16
3.1.2. Malzemeler ve Kullanılan Besiyelesi.....	17
3.1.3. Kullanılan Kimyasalar.....	18
3.1.4. Kullanılan Cihazlar.....	18
3.2. Metot.....	19
3.2.1. Bakterilerin izolasyonu.....	19
3.2.1.1. Setrimid agar.....	20
3.2.1.2. VITEK-2 identifikasyon sistemi.....	20
3.2.2. Kantitatif Biyofilm Oluşumu Analizi.....	20
3.2.2.1 Aşı hazırlanması.....	20
3.2.2.2 DensiCHEK Plus Metre.....	21
3.2.2.3. Kantitatif Biyofilm Oluşum Testi.....	21

3.2.3.VITEK-2 kompakt Antibiyotik Duyarlılık Testi.	23
3.2.4. Bakterilerin genetik çalışmaları.....	24
3.2.4.1. DNA Ekstraksiyonu.....	24
3.2.4.2. DNA Kantitasyonu/Miktar tayini	24
3.2.4.3 Primer hazırlama.....	24
3.2.4.4 Reaksiyon Kurulumu ve Termal Döngü Protokolü.....	25
3.2.4.5. PCR Program.....	26
3.2.5. Agaroz Jel Elektroforezi.....	26
3.2.5.1. Solüsyonlar.....	26
3.2.5.2. Yatay agaroz jelin dökümü.....	27
3.2.5.3.Agaros hazırlığı.....	27
3.2.5.4. DNA yükleme.....	27
3.2.6. İstatistiksel analiz yöntemleri.....	27
 4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	27
4.1 <i>P. aeruginosa</i> 'nın İzolasyonu ve Teşhisi.....	27
4.2. Kantitatif Biyofilm Oluşumu sonuçları	29
4.3. <i>P. aeruginosa</i> İzolatlarının Antibiyotiklere Karşı Direnci.....	31
4.3.1.VITEK 2 Sistemi ile Antibiyotiklerin Duyarlılık Testi Sonuçları.....	31
4.3.2. Biyofilm ve MDR arasındaki korelasyon rezistans.....	32
4.4. PCR Aplifikasyonu.....	34
4.4.1. QS genleri <i>lasI</i> , <i>lasR</i> belirlenmesi sonuçları	34
4.4.2. QS genlerinin varlığı ile biyofilm düzelerine göre dağılımı.....	36
4.4.3. <i>gyrB</i> geni belirlenmesi sonuçları	37
 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	45
5.1 Sonuçlar	45
5.2 Öneriler	46
 KAYNAKLAR	47
 EKLER	61
 ÖZGEÇMİŞ.....	62

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

μL: Mikrolitre
0C: Santigrat derece
dk.: Dakika
g: Gram
sn: Saniye

Kısaltmalar

AMO: Amoksisilin
AMP: Ampisilin
AST: Antibiyotik hassasiyet testi
CF: Kistik fibroz
CIP: Sipprofloksasin
DNA: Deoksiribonükleik asit
FQ: Florokinolonlar
GEN: Gentamisin
gyrB: DNA giraz gen
H₂O: Su
IMI: İmipenem
KF: Kistik fibrozis
lasI: *Quorum Sensing* gen
lasR: *Quorum Sensing* gen
MICs: Minimum inhibitör konsantrasyonlar
NA: Nalidiksik asit
NCBI: National Center for Biotechnology Information
P. aeruginosa: *Pseudomonas aeruginosa*
PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu
QS : *Quorum Sensing*
R: Dirençli
S: Duyarlı
WHO: Dünya Sağlık Örgütü
β-lactams: Beta-laktamazlar
ODC : Optik yoğunluk eşik değeri.

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Biyofilm oluşumu aşamaları.....	9
Şekil 3.1. GloMax® Discover Mikroplaka Okuyucuyu.....	19
Şekil 3.2. Kantitatif Biyofilm Oluşum mikrotiter plaka ELİSA Testi	22
Şekil 3.3. VITEK-2 kompakt sistemi.....	23
Şekil 3.4. PCR cihazı.....	26
Şekil 4.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nın setrimid agar üzerindeki koloni görünümü.....	28
Şekil 4.2. Kantitatif Biyofilm Oluşumu sonuçları.....	30
Şekil 4.3. <i>P. aeruginosa</i> örneklerinin <i>LasI</i> geninin amplifikasyon sonuçlarının %1.5 agaroz jel elektroforezi.....	34
Şekil 4.4. <i>P. aeruginosa</i> örneklerinin <i>LasI</i> geninin amplifikasyon sonuçlarının %1.5 agaroz jel elektroforezi.....	35
Şekil 4.5. <i>P. aeruginosa</i> örneklerinin <i>LasR</i> geninin amplifikasyon sonuçlarının %1.5 agaroz jel elektroforezi	35
Şekil 4.6 <i>P. aeruginosa</i> örneklerinin <i>LasR</i> geninin amplifikasyon sonuçlarının %1.5 agaroz jel elektroforezi.....	36
Şekil 4.7. <i>P. aeruginosa</i> örneklerinin <i>gyrB</i> geninin amplifikasyon sonuçlarının %1.5 agaroz jel elektroforezi.....	38
Şekil 4.8. <i>P. aeruginosa</i> örneklerinin <i>gyrB</i> geninin amplifikasyon sonuçlarının %1.5 agaroz jel elektroforezi.....	38

ÇİZGEİLLER

Çizelge 2.1. <i>P. aeruginosa</i> genom boyutları	5
Çizelge 2.2. <i>P. aeruginosa</i> virölans faktörleri ve görevleri.....	6
Çizelge 3.1. Kullanılan Malzemeler ve kimyasalar.....	18
Çizelge 3.2. Kullanılan Cihazlar	19
Çizelge 3.3. QS, <i>gyrB</i> genlerini belirlemek için Kullanılan primirler.....	25
Çizelge 3.4. Primer hazırlama.....	25
Çizelge 3.5. Bileşen Hesaplaması.....	25
Çizelge 3.6. PCR reaksiyon içeriği.....	25
Çizelge 3.7. PCR Program	26
Çizelge 4.1. İzolasyon kaynağına göre <i>P. aeruginosa</i> izolatlarının sayısı ve yüzde oranları.....	28
Çizelge 4.2. Kantitatif Biyofilm Oluşumu sonuçları.....	29
Çizelge 4.3. Vitek-2 kullanılarak izole edilen <i>P. aeruginosa</i> bakterilerine karşı kullanılan bazı antibiyotiklere direnç, orta duyarlı ve duyarlılık oranları.....	31
Çizelge 4.4. Biyofilm Oluşumu, Çoklu İlaç (MDR) Arasındaki Korelasyon Rezistans	33
Çizelge 4.5. Çoklu İlaç direnci (MDR) örneklerden izole edilen suşların biyofilm yapım şiddeti	33
Çizelge 4.6. Biyofilm şiddet grupları ve MDR 100% ve diğerleri arasındaki İstatistiksel sonuçları	35
Çizelge 4.7. QS Genleri Varlığının Biyofilm Düzeylerine Göre Dağılımı.....	37

1. GİRİŞ

Pseudomonadaceae familyasına ait *Pseudomonas* cinsinde suda ve toprakta yaşayan çeşitli gram negatif, fermente olmayan aerobik basiller bulunmaktadır. Bu tür bakterilerin çoğu bitki ve hayvanlar için patojeniktir. *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Pseudomonas* cinsinde en sık izole edilen insan patojenidir. *P. aeruginosa*, özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış bireyler için önemli bir fırsatçı patojendir (Baştürk, 2005). Hastanelerdeki *P. aeruginosa* enfeksiyonları öncelikle yoğun bakım ünitelerinde tedavi gören yanık ve kronik hastalığı olan hastaları etkilemektedir (Yetkin ve ark., 2006).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda *P. aeruginosa* 'nın neden olduğu enfeksiyonların hastanelerdeki en büyük sorunlardan biri olduğu ve ölüm oranlarının %18'den %61'e yükselttiğini açıkça göstermektedir (Moghaddam ve ark., 2012). Klinik ve çevresel örneklerden *P. aeruginosa* tespiti için geleneksel mikrobiyolojik teknikler güvenilirdir, ancak tamamlanması zaman alır. PCR, hastanelerde enfekte izolatların hızlı bir şekilde tanımlanması ve hastalar için tedavi kararları için kritik öneme sahiptir (Khan ve Cerniglia, 1994; Qin ve ark., 2003). *P. aeruginosa*, birçok antibiyotiğe direnç kazanmış bir bakteri türüdür. Bu bakterinin neden olduğu enfeksiyonları tedavi etmek, şu anda mevcut olan birçok antibiyotiğe direnme kabiliyeti göz önüne alındığında büyük bir risk taşımaktadır (Lister ve ark., 2009; Lari ve ark., 2015). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) yakın zamanda, enfeksiyonların neden olduğu hastalıkları tedavi etmek için yeni antibiyotikler geliştirmek için acilen ihtiyaç duyulan üç bakteri türünden biri olan karbapenem dirençli *P. aeruginosa*'yı dahil etmiştir (Tacconelli ve ark., 2018). Ayrıca tedavi sırasında aşırı antibiyotik kullanımı, *P. aeruginosa*'nın çoklu ilaca dirençli suşlarının gelişimini hızlandırmakta ve bu mikroorganizmalara karşı etkisiz antimikrobiyal tedavi ile sonuçlanmaktadır (Hirsch ve Tam, 2010).

P. aeruginosa genomu (5.5-7 Mb), diğer bakterilerin genomuna kıyasla nispeten büyüktür, metabolizmayı, taşıma ve organik akışı düzenleyen enzimlerin önemli bir parçasıdır. *P. aeruginosa*'nın gelişmiş kodlama kapasitesi, metabolik çeşitliliğe ve çevresel değişikliklere yüksek uyum sağlamaktadır (Klockgether ve ark., 2011). Anaerob gram negatif bakterilerden biri olan *P. aeruginosa*, özellikle yoğun bakım ünitelerinde (YBÜ) hastane enfeksiyonlarının en önemli nedenlerinden biri olarak bilinmektedir (Neuhauser ve ark., 2003). Bu bakteri doğada birçok yerde

bulunabilmesine rağmen yoğun bakım hastaları gibi bağışıklık sistemi zayıf kişilerde fırsatçı enfeksiyonlara neden olabilmektedir (Lyczak ve ark., 2000).

P. aeruginosa, yüksek nemli ve basit besinler içeren bir ortam gibi çeşitli koşullar altında büyüeyebilen her yerde bulunan bir mikroorganizmadır. Antibiyotiklere ve dezenfektanlara karşı yüksek direnci nedeniyle, bu bakteri doktor ve hemşire kıyafetleri, lavabolar, yiyecekler, bilgisayar klavyeleri, kanalizasyonlar, musluklar, içme suları, eczane müstahzarları ve kontamine tıbbi malzeme ekipmanları dahil olmak üzere hastanenin çeşitli alanlarında sıklıkla bulunmaktadır (Davane ve ark., 2014; de Abreu ve ark., 2014).

P. aeruginosa'nın virülansında hem hücresel hem de hücre dışı faktörler önemli bir rol oynamaktadır. Bunlardan özellikle pili, flagella ve lipopolisakkarit gibi yüzey komponentleri ile konak hücre yüzeyine yapışıp ve konak bağışıklık tepkisine neden olmaktadır. *P.aeruginosa* 'nın hücre dışı virülans faktörlerinin salınması, hücre yoğunluğuna bağlı olan ve "asil homoserin lakton" sinyal moleküllerini kullanan "Quorum Sensing" (QS) adı verilen bir mekanizma tarafından kontrol edilmektedir (Sawa ve ark., 1998; Pearson ve ark., 2000). QS sisteminin birçok mikroorganizmada önemli bir virülans faktörü olan biyofilm yapısındada etkili rolü bilinmektedir. QS sisteminin biyofilm oluşumu, olgunlaşması ve dağılması aşamalarındaki rolü birçok çalışma ile belirtilmiştir (Wang ve ark., 2007). Biyofilm yapısı *P.aeruginosa*'nın özellikle kronik akciğer enfeksiyonları başta olmak üzere pek çok enfeksiyonun gelişiminde rol sahipliği göstermektedir (Donlan, 2001).

Birçok QS genleri arasında, özellikle *lasI* geninin, *P.aeruginosa* PAO-1'de olgun biyofilm oluşumu için gerekli olduğu ispatlanmıştır (Davies ve ark., 1998; Wagner ve Iglewski, 2008). Las sistemi *LasI* sentez proteini ve *LasR* transkripsiyonel düzenleyici proteini içermektedir. *LasI* sistemi AHL sinyal moleküllerinden “N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone” (3-O-C12-HSL)’un üretimi için gereklidir. *LasR*'nin varlığının, transkripsiyonel faktör aktivasyonunu başlatma komutu veren "3-OC12-HSL" için gerekli olduğu belirtilmiştir. Son zamanlarda, *LasR* proteininin sadece multimer formlarından “3-O-C12-HSL”un varlığında özgül DNA dizilerine bağlanabildiği ve hedef genlerin transkripsiyonunu arttırdığı gösterilmiştir (Smith ve Iglewski, 2003; Baysse ve ark., 2005).

P. aeruginosa 'nın neden olduğu enfeksiyonların çoklu direnç mekanizmaları nedeniyle tedavisi zor olmaktadır (Bassetti ve ark., 2018; Nguyen ve ark., 2018b). *P. aeruginosa* 'nın direnç mekanizmaları arasında doğuştan gelen direnç, kazanılmış direnç

ve adaptif direnç yer almaktadır (Shariati ve ark., 2018). Bu karmaşık ve çeşitli direnç mekanizmaları, *P. aeruginosa* 'nın neden olduğu enfeksiyonları yaşamı tehdit edici hale getirmektedir. Bu arada, *P. aeruginosa* 'nın birçok antimikrobiyal ilaca karşı direnci, dünya çapında bir halk tehdidi olarak ortaya çıkmaktadır (Moradali ve ark., 2017). Florokinolonlar (FQ'lar) önemli bir antimikrobiyal sınıftır. *P. aeruginosa* 'nın neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılan, aralarında siprofloksasin (CIP) veya levofloksasin (LEV) bulunan ilaçlar sık kullanılmaktadır (Nouri ve ark., 2016; Nguyen ve ark., 2018a). FO'lar, DNA replikasyonunu inhibe etmek için hücre içi hedefleri, DNA gyrase ve topoisomerase IV'ü inhibe ederek etki etmektedir. DNA gyrase, gram-negatif bakterilerde birincil hedef olma eğilimindeyken, topoisomerase IV, gram-pozitif bakterilerde tercihen FQ'lar tarafından inhibe edilmektedir (Jedrey ve ark., 2018).

FQ'ların *P. aeruginosa*'ya karşı spesifik direnç mekanizmalarının incelenmesi, uygun antibiyotiklerin seçilmesinde, dirençli suşların ortaya çıkmasının önlenmesinde ve yeni antimikrobiyal ilaçların geliştirilmesinde yardımcı olur. Birkaç çalışma FQ 'ya dirençli *P. aeruginosa*'da *gyrB* mutasyonları bildirmiştir. Ayrıca, *gyrB* mutasyonları ve ilaç direnci arasındaki ilişki mevcut literatürlerde açık değildir. Bu, *P. aeruginosa*'nın *gyrB* mutasyonlarının FQ'lara dirençte bir rol oynayıp oynamadığı sorusunu gündeme getirmektedir (Drlica ve ark., 2008). Bu çalışmada, klinik *P. aeruginosa* izolatlarının antibiyotiklere karşı direncinin, biyofilm üretiminin, QS'in *lasI*, *lasR* virülans genlerinin varlığının ve direnç geni *gyrB*'nin belirlenmesinin ve aralarındaki ilişkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Bakterilerin Tarihçesi ve Sınıflandırılması

1850'de Sédillot cerrahi salgılarda mavi-yeşil akıntının geliştiğini ve bunun enfeksiyon ile ilişkili olduğunu söylemiştir. 1862'de Luke mavi-yeşil irinde çomak şeklinde mikroskopik canlıların olduğunu gözlemlemiştir. 1882'de Gessard bakteriyi ilk kez izole etmiştir ve *Bacillus pyocyaneus* olarak adlandırmıştır. Daha sonra diğer mikrobiyologlar da çeşitli enfeksiyon bölgelerinden mikroorganizmayı izole etmişlerdir (Lyczak ve ark., 2000; Moore ve Flaws, 2011). 1925'te Osler ilk kez *P. aeruginosa*'nın primer enfeksiyonlardan ziyade sekonder ya da fırsatçı enfeksiyonlara neden olduğunu dile getirmiştir (Lister ve ark., 2009).

Bu cinsin 25'ten fazla türü, çoğu fırsatçı olan insan enfeksiyonlarına neden olur (Stover ve ark., 2000). Sınıflandırmada kullanılan ilk yöntem morfolojik özelliklere dayanarak yapılmıştır. İkinci sistem, DNA ve RNA arasındaki benzerliklere dayanmaktadır (Al-Qasi, 2012). Bergey's Systematic Bacteriology'ye göre *P. aeruginosa*'nın bilimsel sınıflandırması şu şekildedir (Brown, 1939).

Üst âlem: Bacteria

Şube: Proteobacteria

Sınıf: Gamma Proteobacteria

Takım: Pseudomonadales

Familya: Pseudomonadaceae

Cins: Pseudomonas

Tür: *Pseudomonas aeruginosa*. (Nakano ve ark., 2015).

2.2. *Pseudomonas aeruginosa*'nın Özellikleri

P. aeruginosa, Pseudomonadaceae familyasının en önemli patojenik türüdür. Gram negatif, düz veya hafif kavisli çubuk şeklinde, 0,5-3 µm ila 1,5-3 µm boyutlarında, mobilizasyon için bir flagellum'a sahip ve aerobik bakterilerdir. *P. aeruginosa* suşları temelde 2 çeşit pigment üretirler: Piyosiyanin (mavi) ve piyoverdin (veya fluorescein-sarı-yeşil). Bu pigment alkali pH'da mavi veya yeşilimsi renk oluşturduğu için "aeruginosa" adı verilmiştir (SIRIKEN ve Veli, 2017). Özellikle bağışıklığı baskılanmış hastalarda çok çeşitli yaşamı tehdit eden akut ve kronik enfeksiyonlara neden olabilen fırsatçı bir insan patojenidir (Baştürk, 2005). Hastanelerde, *P. aeruginosa* enfeksiyonları öncelikle yoğun bakım ünitelerinde tedavi gören yanık ve kronik hastalığı olan hastaları etkilemektedir (Yetkin ve ark., 2006).

Kistik fibrozis (KF) hastalarında morbidite ve mortalitenin ana nedeni olması ve çok çeşitli antibiyotiklere özünde dirençli olmakla birlikte hastanede yatan hastaları etkileyen önde gelen nozokomiyal patojenlerden biri olması nedeniyle özellikle önemlidir (Moradali ve ark., 2017). Çoğu Gram-negatif bakteriden *Pseudomonas aeruginosa*, oksidaz reaksiyonu için pozitifdir. Ayrıca, laktozu fermente edemez. *Pseudomonas* cinsinin bakterileri doğada yaygındır ve fırsatçı enfeksiyonlara neden olmaktadır. *P. aeruginosa* birden fazla antibiyotiğe direnç geliştirerek tedavide sorunlara neden olmaktadır. Bu nedenle, gram-pozitif ve gram-negatif bakteriler tarafından

üretilebilen ve klinik olarak önemli beta-laktamazlara karşı oldukça dirençli olan üçüncü kuşak bir sefalosporin antibiyotik olan seftazidim kullanılırken antibiyotiklere duyarlılığın izlenmesi gereklidir (Caldwell ve ark., 2009).

Fırsatçı bir patojen olan *P. aeruginosa*, konakçısını enfekte etmek için zayıflamış bir konakçı hücreye ihtiyaç vardır (Düzgün, 2009). Bu durum, hastane şartlarında tedavi amaçlı bulunan hastalarda bu tip fırsatçı patojenlerinin ne denli olumsuz sonuçlar doğuracağını kanıtı olabilmektedir (Baron ve ark., 1996). *P. aeruginosa* 'nın enfeksiyon sırasında farklı seviyelerde etki gösteren ve hem konakçı organizmada hem de ekolojik ortamda hayatta kalmalarını sağlayan virülans faktörlerine bağlıdır. *P. aeruginosa* güçlü virülans faktörleri hem hücre içinde hem de hücre dışında olabilmektedir (Lazdunski ve ark., 2004).

2.3. *Pseudomonas aeruginosa* Genomu

P. aeruginosa suşları, genom boyutunda (~ 5-7 Mbp) diğer bakterilerden farklıdır. Metabolik kapasiteleri, çok sayıda ikincil metabolit ve polimer üretme yetenekleri ve ayrıca çeşitli karbon kaynaklarını ve elektron alıcılarını kullanma yetenekleri ile geniştir. Yüksek oranda korunmuş *P. aeruginosa* genlerinin, bilinen bakteri genomlarında gözlemlenen genlerin ve düzenleyici ağların en yüksek oranı olduğu ve çeşitli etkileşimlere yanıt vermek ve bunlara uyum sağlamak üzere kodlandığı ileri sürülmektedir (Stover ve ark., 2000; Mathee ve ark., 2008; Frimmersdorf ve ark., 2010). Genom hem çevresel ve klinik örneklerden hem de laboratuvar suşlarında izole edilmiş kültür suşlarında yüksek oranda korunmaktadır. Bu genomun önemi, bakterilere çok çeşitli metabolik yollar ve bakterilerin birçok farklı ortama uyum sağlamasına izin veren fizyolojik tepkiler sağlamasıdır (Lee ve ark., 2006). *P. aeruginosa* genomu Çizelge 'de gösterilmektedir (Mathee ve ark., 2008).

Çizelge 2.1. *P. aeruginosa* genom boyutları

Suş	PA2192	C3719	PAO1	PA14	PACS2
Genom Büyüklüğü (bp)	6,905,121	6,222,097	6,264,404	6,537,648	6,492,423
ORFs	6,191	5,578	5,571	5,905	5,676

2.4. Epidemiyoloji

Basitlikleri ve büyüme kolaylıkları nedeniyle, her yerde bulunan *P. aeruginosa* bakterisine maruz kalmaktan kaçınmak neredeyse imkansızdır (Moore ve Flaws, 2011).

Hastanede hastaların nemli vücut bölgelerinde (aksilla, kulak, perine) kolonize olabilir ve lavabolar, musluklar, tuvaletler ve duşlar gibi nemli cansız yüzeylerden de izole edilebilir. Göz damlası ve merhemlerinde, bazı antiseptik solüsyonlarda ve kontakt lens solüsyon ve preparatlarında üremesi gözlenmiş, anestezi maskelerinde de varlığı tespit edilmiştir (Zhapouni ve ark., 2009). *P. aeruginosa*, plastikler, implantlar metaller, ve tıbbi dokular dahil olmak üzere farklı yüzeylere yerleşen ve yok edilmesi çok zor olan karmaşık bakteri topluluklarıyla biyofilmler oluşturma eğilimindedir (An ve ark., 2003).

P. aeruginosa insan vücudunda serbest olarak yaşayan bir bakteri türü değildir, sindirim sistemi florasında az miktarda bulunmaktadır (Moore ve Flaws, 2011). 45-50°C sıcaklığa dayanıklıdır ve distile suda bile gelişebilir. Ancak düşük pH değerlerinde ($\leq 4,5$) yaşayamaz (Pollack, 1990).

2.5. Patogenez ve Virülans Faktörler

P. aeruginosa, çoklu virülans faktörleri içerdiğinden ciddi bir patojendir. Endokardit, dermatit, idrar yolu enfeksiyonları, göz, kulak, kemik, eklem ve özellikle solunum yolu enfeksiyonları gibi farklı enfeksiyonlara sebep olmaktadır. *P. aeruginosa* enfeksiyonlarına aşırı duyarlı olan kistik fibrozlu hastalar kötü prognoz ve mortalite gösterir. *P. aeruginosa*'nın patogenezini, bu bakterilerin patogenezinde ve dokuların invazyonunda önemli rol oynayan çok sayıda hücrel ve hücre iskeleti faktörüne bağlı bir takım virülans faktörlerine sahiptir (Çizelge 2.2) (Domingo-Calap ve ark., 2016; Al-Wrafy ve ark., 2017). Ayrıca, artan antibakteriyel direnç oranlarına katkıda bulunan birkaç antibakteriyel direnç mekanizması sergilemektedir.

Çizelge 2.2. *P. aeruginosa* virülans faktörleri ve görevleri

Virülans Faktör	Görevi
Pili	Hücre yüzeyine yapışma, seğirme hareketliliği, biyofilm oluşumu ve konakçı bağışıklık sistemi ve antibiyotiklerden kaçınma sağlar.
Flagellum	Motilite, kemotaksi, başlangıç yüzey etkileşimlerine aracılık
T2SS	
Ekzotoksin A	Ökaryotik protein sentezini inhibe eder.
Tip IV Proteaz	Stafilolizin, elastaz ve stafilolitik aktivite ile çinko metaloproteaz.
Alkaline Proteaz	Elastaz, kolajen ve kolajen olmayan konakçı proteinleri bozumu, fiziksel engelleri barındırma,
Proteaz IV	opsonize edici akciğer yüzey aktif madde proteinleri A ve D'yi bozma ve monosit kemotaksisini inhibe eder.
Fosfolipaze H	İmmünoglobulinleri, komplemanı, A ve D yüzey aktif
LasA	
LasB	

	proteinlerini, fibrinojen, plazminojen ve antibakteriyel peptitleri bozar. Kompleman aktivasyonunu, nötrofil fagositozunu ve fibronektini inhibe eder. Transferrin, elastin, laktoferrin, decorin ve kazeini ayırır. Sümfaktan lipitlerini ve fosfolipidleri, hemolize eritrositleri yok eder.
T3SS	
ExoY ExoS ExoT ExoU	Apoptoz, nekroz, konakçı bağışıklık hücrelerinin öldürülmesi, hücre iskeletinin bozunması ve DNA sentezinin inhibisyonuna yol açar. Apoptoz, hücre bölünmesinin durdurulması, aktin hücre iskeletini değiştirir, fagositozu engeller, hücre göçünü, yapışmayı ve proliferasyonu engeller. Nekroz ve fagositlerin yanı sıra epitel bariyerlerin ortadan kaldırılmasını sağlar. Aktin hücre iskeletinin bozulması ve endotel geçirgenliğinin arttırılmasına yol açar.
T5SS	Hedef ökaryotik hücreler, biyofilm oluşumu, hücrel ve antibakteriyel fonksiyonları etkileme
Lectinler (LecA ve LecB)	Konakçı hücrelere yapışma, akciğer hasarı ve biyofilm oluşumu
Sideroforlar	Demir noksan ortamlardan demir alımı
Piyosiyenin	Solunum sistemindeki siliyer disfonksiyon, konakçı hücrelere zarar veren pro-enflamatuar ve oksidatif etkiler uygular.
Quorum sensing (LasR-LasI ve RhlR-RhlI)	Biyofilm oluşumu, çeşitli virülans faktörlerinin regülasyon ekspresyonu, değişen mikrobiyal popülasyon yoğunluğuna yanıt
Lipopolisakkaritler	
Lipid A O-spesifik polisakkarit	Endotoksik şok Antikor üretimini sağlamaktan sorumlu
Biyofilm	
Alginate Psl Pel	CF akciğerlerdeki ve bağışıklık savunmasındaki ortamlardan koruyucu faktör, yapısal stabilite ile biyofilmlerin korunması ve antibiyotik direnci. Bağışıklık direnci, antibiyotik direnci, olgun biyofilmlerde yapısal iskele ve bakterilere yapısal destek vermek için eDNA-Psl liflerinin oluşumu. Biyofilm oluşumu, antibiyotik direnci ve adezinler için birincil yapı iskelesi.
eDNA	Antibiyotik direnci

P. aeruginosa'nın enfeksiyon sırasında farklı seviyelerde etki gösteren ve hem konakçı organizmada hem de ekolojik ortamda hayatta kalmalarını sağlayan virülans faktörlerine bağlıdır. *P. aeruginosa* güçlü virülans faktörleri hem hücre içinde hem de hücre dışında olabilmektedir (Lazdunski ve ark., 2004). Kimyasal sinyalin, lokal ekstraselüler konsantrasyonunun belirli bir seviyeye ulaşması, çevrede bulunan bakteriler için o bölgede belirli yoğunlukta bir hücrel kümelenmenin başladığı anlamına gelmektedir. Kimyasal olarak popülasyon yoğunluğunun hissedilmesi işlemine “Quorum Sensing” (QS) adı verilir (March ve Bentley, 2004).

QS; bakteri hücre yoğunluğuna bağlı gen ekspresyonunu kontrol eden sistemdir (De Kievit ve Iglewski, 2000). *P.aeruginosa*'da ve çoğu gram negatif bakteride QS sinyal molekülleri açıl homoserin laktondur (Smith ve Iglewski, 2003; Tacconelli ve ark., 2018). QS; yüksek hücre yoğunluğunda spesifik genleri aktive ederek kemoterapi uyaranların serbest bırakılmasını içeren bir mekanizmadır. Kendi kendini motive ederek yayılabilir, bağlanabilir. Hücre miktarı arttığında otoindükleyici (N-asetillenmiş homoserin lakton) konsantrasyonunu artırır ve hedef hücrelere bağlanarak, (LasR-LasI ve RhIR-RhII gibi) otomatik uyarıcı protein kompleksi, QS'yi kontrol eden genleri aktive etmekte büyük rol oynamaktadır (Schaber ve ark., 2004).

LasR, belirli virülans faktörlerini kodlayan genlerde transkripsiyonu başlatmak için otomatik indüklenebilir HSL ile birleşir. LasB tarafından kodlanan Elastaz, *lasA* tarafından kodlanan proteazlar, *ToxA* tarafından kodlanan eksotoksin A ve *aprA* geni tarafından kodlanan alkalın fosfataz üretimi başlatılır ve bakterinin virülansı artar. QS, *P. aeruginosa* biyofilmlerinin oluşumunda önemli rol oynamaktadır. LasI üretemeyen mutant *P. aeruginosa*'nın sağlam bir biyofilm oluşturamadığı ve mikro-kolonyal aşamada biyofilm oluşumunu durdurduğu gösterilmiştir (Shrout ve ark., 2006).

P. aeruginosa'nın QS'sinin özellikleri:

a) Sistemin taşıyıcı özelliği yoktur. Bu, iki sistem ürünü arasında bir ilişki olmadığı anlamına gelir.

b) Genlerin bazı kısımları iki çift gen tarafından kontrol edilirken, diğerleri tek bir gen tarafından kontrol edilir. Bu genler kendi kontrolleridir. Buna göre, LasR proteini/C-HSL, *lasI* geni, kontrol 12'ye sahiptir. RhIR geninin yayılmasını düzenlerler. rhIR proteini/C-HSL ayrıca *rhl* geni 4 transkripsiyonunu da düzenler.

c) ATG başlangıç kodununun 40 bp kontrolü altında LAS-Box'a yükselen C-terminal motifleri sarmal sarmal. Las-Box 20 baz çifti bölgesinden oluşur. C-terminalindeki amino asitler polimerizasyona katılır.

d) RhI sistem R proteini, C-HSL birimleri olsun ya da olmasın bir dimer oluşturur ve DNA 4'e bakar. AI ile birleştirilirse hedef genin korunması (Pesci ve ark., 1999).

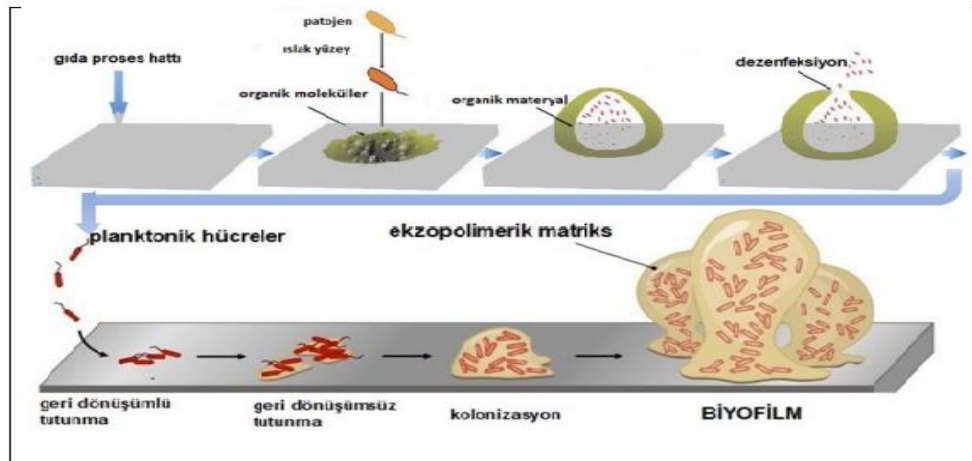
2.6. *P. aeruginosa* da Quorum Sensing Genleri ve Biyofilm oluşumu arasındaki ilişkiler

P. aeruginosa enfeksiyonlarının patogeneğinde konakçı ve bakteriyel faktörler rol oynamaktadır. Bakterilerin virülans faktörleri iki grup altında toplanabilir; Hücresel ve hücre dışı faktörler.

Virülans faktörlerinin salınması, mikroorganizmanın büyümesinin logaritmik fazında karmaşık bir sistem içinde gerçekleşir (Woods, 2004). *P. aeruginosa*, hücre yüzeyi bileşenleri, hücre dışı enzimler ve toksinler dahil olmak üzere çeşitli virülans faktörlerine sahiptir. Bir faktörün virülans faktörlerinin çoğu iki farklı düzenleyici sistem tarafından kontrol edilir. Bu sistemler; İki bileşenli bir transkripsiyon düzenleyici (bileşen) ve *quorum sensing* (QS) sistemidir. Bu iki mekanizma, mikroorganizmanın konakçıda hayatta kalması ve çoğalması için gereklidir (Ben Haj Khalifa ve ark., 2011)

Biyofilm; Mikroorganizmaların birbirlerine, bulundukları yüzeylere veya bulundukları yüzeylerden alt katmanlara yani arayüzeylere geri dönüşümsüz olarak tutunmalarını ve tutunmalarını sağlayan (EPS) "hücre dışı polimerik madde" matrisine verilen isimdir. büyüme hızına ve gen transkripsiyonuna bağlı olarak farklı fenotipik özellikler kazanarak salgılamaktadırlar (Shunmugaperumal, 2010). Biyofilm oluşurken mikroçevredeki değişiklikler de gen ifadelerinde değişikliklere neden olur ve biyofilm oluşumunu hızlandırır. Biyofilm oluşturan genetik materyal, plazmidler aracılığıyla kolayca aktarılır. Biyofilm oluşumu beş aşamada gerçekleşir (Post ve ark., 2004). Bu aşamalar;

- 1) Yüzeyin uygun duruma getirilmesi (Surface conditioning),
- 2) Geri dönüşümlü tutunma (reversible attachment),
- 3) Geri dönüşümsüz tutunma (irreversible attachment)
- 4) Kolonizasyon
- 5) Kopma.



Şekil 2.1. Biyofilm oluşumu aşamaları

Biyofilm sayesinde EPS içerisine gömülü olarak yaşamlarına devam eden mikroorganizmalar bağışıklık sistemi elamanlarından, antibiyotiklerden, patojenlerin üretmiş olduğu antimikrobiyal ürünlerden, kimyasal, fiziksel ve biyolojik streslerden korunmaktadırlar (Nouraldin ve ark., 2016).

Son araştırmalarda biyofilmdeki bakterilerin antibiyotiklere karşı 1000 kat daha dirençli olduğu tesbit edilmiştir. Dolayısıyla biyofilmdeki mikroorganizmaların planktonik formlarına göre yaşadıkları ortamda hayatta büyüme ve kalma şansları daha fazladır (Hassan ve ark., 2011).

Pseudomonadaceae familyasına ait Gram negatif bir bakteri olan *P. aeruginosa*, biyofilm oluşturma özelliği ve çok hızlı direnç kazanabilmesi nedeniyle son yıllarda görülme sıklığı yüksek bir mikroorganizma olarak ortaya çıkmıştır (Rasamiravaka ve ark., 2015). QS, yoğun bakteri topluluğunu tanımada çok önemlidir. Bu tür bir düzenleme, topluluk düzeylerinde bakteri davranışını kontrol etmektedir (Davies, 2003). Bu aşamadaki yapışma, kimyasal bağdan ziyade elektrostatik etkileşimle olduğu için tersine çevrilebilmektedir. Bununla birlikte, bazı hücreler yapıları daha sıkı bağlar oluşturacak şekilde şekillendirerek biyofilmin ikinci aşaması olan geri dönüşümsüz bağlanma için bir avantaj sağlar (Costerton ve ark., 2005). EPS üretimi için bakteri hücrelerinin yüzeye geri dönüşümsüz bağlanması, bakteri hücrelerinin zara bağlı eksitator proteinlerinin uyarılmasıyla şekillenir (Boyd ve Chakrabarty, 1995). Bu uyarım, bakteri hücreleri arasında köprülerin oluşmasına ve ardından yüzeyde bakteri yığınlarının oluşmasına olanak sağlar (Donlan, 2002; Hall-Stoodley ve ark., 2004). Biyofilm bileşimindeki "İlişkili Protein Yapısı" (Biyofilm ile ilişkili protein-BAP) sayesinde organizmalar yüzeyde kolonize olabilir ve orada kalıcı olarak kalabilir. Bu nedenle BAP çok önemlidir (Tormo ve ark., 2005). Örneğin, alginatın *P. aeruginosa* yüzey yapışmasında ve biyofilm gelişiminde tamamlayıcı olduğu bilinmektedir (Hall-Stoodley ve ark., 2004).

Tutunma sürecinden sonra biyofilm oluşturmak için farklılaşma sürecinin başlaması, QS sisteminden gelen iletişim sistemindeki yanıtlara bağlıdır. Bu sistem ile bakteriler bulundukları ortamdaki bakteri popülasyon yoğunluğunu belirlemektedir. Bir yüzeye tutunmuş her bakteri, çevreye mesaj gönderen bir molekül salgılar. Yüzeye tutunan bakterilerin sayısı arttıkça, bu sinyalin lokal konsantrasyonları fazlalaşmaktadır. Bu sinyal molekülünün (otostimülatör-otoindükleyici-AI) konsantrasyonundaki artışla birlikte, biyofilm oluşumu için bir dizi işlem başlatılır. Biyofilmdeki bakteriler, hücreler arası ve düşük moleküler ağırlıklı haberciler aracılığıyla iletişim kurarlar (Şahin, 2007).

Bazı çalışmalarda tek hücreli bakterilerin birbirleriyle iletişim kurabildiğini ve değişen bir ortama yanıt verebildiğini göstermiştir. Böyle bir hücreden hücreye iletişim kaskadı (multipleks algılama), bakteri topluluklarında gen ekspresyonunun tutarlılığı ve fonksiyonel yönetiminde önemli roller oynadığı bilinmektedir.

Hücre yoğunluğuna bağlı olarak QS; Bakteriler çevreyi tarar ve küçük sinyal moleküllerinin birikmesine tepki vererek onları serbest bırakır. Bu tür etkileşimlerin bir sonucu olarak, bir grup hedef gen düzenlenir. Bu mekanizma, belirli bir sinyal yoğunluğuna ulaşıldığında belirli genlerin açılmasını sağlar (Dong ve Zhang, 2005). QS sistemindeki mekanizma, otomatik olarak sinyal üretebilen AI moleküllerinden oluşur. Bunun nedeni ise üretildikleri hücrenin metabolizmasını düzenleyici etkiye sahip olmalarıdır (Novick ve Muir, 1999; Donabedian, 2003).

P. aeruginosa ve diğer Gram-negatif bakteriler tarafından üretilen ve tür içinde kullanılan Als ana sınıfının “N-Asil homoserin laktonlarını (AHL’ler-N-asillenmiş homoserin lakton)” oluştururlar. AHL’ler 4 ila 18 Karbon (C), uzun asil zincirleri taşıyan homoserin lakton halkalarından oluşur (Tacconelli ve ark., 2018). Bu yan zincirlerde C3 pozisyonundaki modifikasyonlar veya doymamış çift bağlar nadiren görülür (Ruby, 1996). *P. aeruginosa*’daki QS sistemi, hiyerarşik bir QS döngüsü tarafından kontrol edilir. *P. aeruginosa*’da üç ana QS sistemi vardır. Bunlar;

- 1) RhII-RhIR
- 2) LasI-LasR
- 3- PQS

Bu sistemler virülans faktörü gen ekspresyonunu ve biyofilm oluşumunu kontrol etmektedir. *P. aeruginosa*’nın QS sistemi genlerinin işlevleri tek başına değil, birlikte çalışır. Diğer bir deyişle, rhl genlerinin ekspresyonu, las genlerinin regülasyonu altında gerçekleşir (Girard ve Bloemberg, 2008). *lasR-lasI*, *rhlR-rhII* sistem genlerindeki mutasyonların piyosiyenin üretiminde azalmaya sebep olduğunu tesbit olmuştur (McKnight ve ark., 2000; Cao ve ark., 2001; Gallagher ve ark., 2002). *P. aeruginosa*’da las QS Sistemin bileşenleri; oto-uyaran sentaz geni olan *lasI*, sentaz geninin ürünü N-(3-okso-dodekanoyl)-L-homoserin lakton (3-okso-C12-HSL) ve transkripsiyonel aktive edici proteini kodlayan *lasR* genidir (Gambello ve ark., 1993). QS sistemi biraz daha açıklanırsa; *lasI* ve *rhII* genlerine Als denir. Las geninin işlevi ilk olarak LasB elastaz enzim aktivitesinin keşfiyle ortaya çıktı. Bu nedenle *P. aeruginosa*, QS sisteminde las

geni olarak adlandırılmıştır (Van Delden ve Iglewski, 1998; Pesci ve ark., 1999). Bu QS sinyali, *P. aeruginosa* hücrelerine diffuze edebilir.

Autoinducer AI'ler belli bir kritik alt sınır konsantrasyonuna ulaştığı zaman, AI'ler LasR proteine bağlanır ve daha sonra (LasR-AI) kompleks şekillenir. Bu kompleks daha sonra birçok virülans faktörünü kodlayan genlerle birlikte bir dizi hedef geni tetikler. Örneğin; *toxA*, *lasA*, *lasB*, *aprA* ve *xcpR* ve *xcpP* gibi. Bu genlerin yanı sıra LasR-AI kompleksleri, *lasI* genlerinin salınmasına neden olur. İkinci gen olan *RhlI*; N-butyryl homoserin lakton'u (C₄ -HSL) kodlar. *RhlI* geni elastaz, ramnolipid, piyosiyenin, siyanid gibi faktörlerin üretimini kontrol eder. Bu moleküller, LasR ve *RhlR* adı verilen transkripsiyonel düzenleyicileri aktive etmeye başlar (Smith ve Iglewski, 2003). Böylece biyofilmdeki bakteriler, virülans faktörlerinin salınımını artırarak patogeneizde rol oynamaktadır.

2.7. *P. aeruginosa*'nın Antibiyotiklere Direnci

Pseudomonas cinsinin bakterileri doğada yaygındır ve fırsatçı enfeksiyonlara neden olmaktadır. *P. aeruginosa* birden fazla antibiyotiğe direnç geliştirerek tedavide sorunlara neden olmaktadır. Bu nedenle, gram-pozitif ve gram-negatif bakteriler tarafından üretilebilen ve klinik olarak önemli beta-laktamazlara karşı oldukça dirençli olan üçüncü kuşak bir sefalosporin antibiyotik olan seftazidim kullanılırken antibiyotiklere duyarlılığın izlenmesi gereklidir (Caldwell ve ark., 2009). *P. aeruginosa*, Gram negatif enfeksiyonların tanınmasında bir belirteç görevi gören en önemli ve yaygın olarak kabul edilen patojenlerden biridir. Bu organizmanın dikkate alınması önemlidir, çünkü özellikle bağışıklığı baskılanmış konakçılarda ciddi nozokomiyal enfeksiyonlara neden olur ve sıklıkla antibiyotik direnci, tedavi sürecini zorlaştırması ve yüksek mortalite ile ilişkilidir (do Nascimento ve ark., 2022). *P. aeruginosa* çevresine kolayca uyum sağlar ve ayrıca ciddi bir enfeksiyona neden olmak için bir insan konakçıya ihtiyaç duyar ve onu istila edebilir (Kalurazi ve ark., 2021).

Büyük genomlarında (>6 Mb) kodlanan çok sayıda (>%8) düzenleyici genin sağladığı çok yönlülük ve uyarlanabilirlik, olağanüstü virülans belirteçleri içeriğinden kaçınma konusundaki olağanüstü kapasitesi ve antimikrobiyal tedavilerin etkinliği, *P. aeruginosa*'yı korkulan bakteriyel patojenlerden biri yapmaktadır. Özellikle kronik enfeksiyonlarda yaygın olan mutasyon varyantlarının ortaya çıkması, *P. aeruginosa*'da adaptasyon kabiliyetini ve antimikrobiyal direnç gelişimini daha da artırmıştır (Cabot

ve ark., 2016). *P. aeruginosa* genetik olarak olağanüstü antibiyotik direnç mekanizmalarına sahiptir (Cabot ve ark., 2016). *P. aeruginosa* indüklenebilir bir AmpC sefalosporinaz taşır ve üretimi yalnızca düşük bir bazal seviyededir. Bu onları antiapoptotik penisiline duyarlı hale getirir. Bununla birlikte, üretimi önemli ölçüde arttığında, *P. aeruginosa* tüm β -laktamlara karşı direnç geliştirir, yani *P. aeruginosa* indüklenebilir bir AmpC β -laktamaz içerir ve bu enzimi indükleyen ve hidrolize eden β -laktamlara doğal olarak dirençlidir (Livermore, 2002; Mouly, 2018). Ayrıca, *P. aeruginosa* çok sayıda büyük dış zar gözeneklerinin varlığı nedeniyle oluşan bir porin (OprF) ürettiğinden, çoğu antibiyotik psödomonal hücrelerden ekstrakte edilir ve bu çoğunlukla hücrenin geçirgenliğine atfedilir (Benz ve Hancock, 1981; Mouly, 2018). Ancak, bu geçirimsizlik aracılı direnç aslında β laktamları, florokinolonlar, kloramfenikol, novobiocin, makrolidler, sülfonamidler, tetrasiklin ve trimetoprimin yanı sıra farklı boyaları ve deterjanları gideren bir pompa sistemi olan MexA B-OprM tarafından yürütülmektedir (Poole, 2001).

2.8. *P. aeruginosa* 'da Kromozomal DNA'nın mutasyonu ve *gyrB* geni

Kromozomal DNA'nın mutasyonu ile ilaçların hedef bölgesinin modifikasyonu, *P. aeruginosa* tarafından direnç kazanmanın başka bir yoludur. Kinolon hedef enzimleri DNA giraz ve topoizomeraz IV'ü kodlayan genlerdeki QRDR modifikasyonları, kinolon antibiyotiklere direnç kazandırır (JALAL ve WRETLIND, 1998; Mouly, 2018). *P. aeruginosa* direncinden OprD kaybı, tip II topoizomerazlardaki değişiklikler, AmpC aşırı üretimi, akış pompaları, kromozomal DNA'daki mutasyonlar ve çoklu edinilmiş genler sorumludur. Bununla birlikte, DNA giraz (*gyrA*) ve topoizomeraz IV'ü (*parC*) kodlayan hedef genlerdeki mutasyonlar, florokinolon direnci kazanmanın ana mekanizmalarıdır (FIROUZI ve ark., 2016). FO'lar, DNA replikasyonunu inhibe etmek için hücre içi hedefleri, DNA girazı ve topoizomeraz IV'ü inhibe ederek etki eder. DNA giraz, gram negatif bakterilerde birincil hedef olma eğilimindeyken, topoizomeraz IV, gram-pozitif bakterilerde tercihen FQ'lar tarafından inhibe edilir (Jedrey ve ark., 2018). FQ'ların *P. aeruginosa*'ya karşı moleküler direnç mekanizmaları esas olarak *gyrA* ve *gyrB*'deki mutasyonlar yer almaktadır. Ayrıca bazı çalışmalara göre *gyrB* geni mutasyonu ilaç direncinde daha önemli bir rol oynamıştır (Gorgani ve ark., 2009).

2.9. Yapılan Diğer Araştırmalar

Kingsley ve Verghese (2013) çalışmalarında, *Pseudomonas aeruginosa*'nın klinik izolatu tarafından üretilen, OXA-4 adı verilen genişletilmiş bir β -laktamaz spektrumu tanımladılar. ESBL üretimini belirlemek için çift disk sinerji testi kullanıldı. *P. aeruginosa* izolatu SVA ve hipertansiyon tanısı alan 84 yaşındaki erkek hastadan elde edildi. PCR ve GSBL üreten OXA bölgesi laktamazları, OXA-4 bölgesini kodlayan genlerin bölgelerine özgü primerler ile tespit edildi. Dizileme yardımıyla, OXA β -laktamazın OXA-4 geni olduğunu belirlediler (Kingsley ve Verghese, 2013).

Sana'a (2013), yara ve yanık örneklerinden elde edilen *Pseudomonas aeruginosa*'nın moleküler tespiti için iki ayrı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) analizi gerçekleştirmiştir. İki gen, yani ekzotoksin A geni ve dış zar lipoprotein (*oprI*) geni, *P. aeruginosa* için spesifik belirteçler olarak hedeflendi. Bu çalışmada her *P. aeruginosa* ve diğer *Pseudomonas* türleri için yedişer izolat kullanıldı ve bakteri süspansiyonu DNA şablonu olarak kullanıldı. Sonuçlar, tüm *P. aeruginosa* izolatlarının genişletilmiş boyutta (196 bp) *oprI* geni için pozitif PCR ürünü verdiğini, buna karşın yalnızca 4 izolatın genişletilmiş boyutta (396 bp) *ExoA* genini barındırdığını gösterdi. *Pseudomonas spp.* PCR ürün sonuçları; yedi izolattan hiçbirinin *ExoA* geni için pozitif olmadığını ve sadece 4'ünün *oprI* geni için pozitif olduğunu bildirdi. Bu araştırma ile *P. aeruginosa*'nın *ExoA* ve *oprI* genleri kullanılarak PCR analizi ile yara ve yanık örneklerinden moleküler tespitin hızlı bir şekilde yapılabileceğini öne sürmüşlerdir (Sana'a, 2013).

Davies ve arkadaşlarının daha önce yapmış oldukları bir çalışmada, *lasI* mutanlığı *P. aeruginosa*'nın oluşturduğu biyofilmin *P. aeruginosa*'nın mutant olmayan tipinin oluşturduğu biyofilme göre oldukça zayıf yapıda olduğunu, çok düşük 52 konsantrasyonlarda SDS'nin deterjan etkisine dayanamadığını ve ortama HSL eklenmesi ile biyofilmin dayanıklılığının arttığını göstermişlerdir. Bunun sonucunda las QS sisteminin olgun biyofilm oluşumu ve biyofilm farklılaşmasında temel sistem olduğunu rapor etmişlerdir (Davies ve ark., 1998).

İsviçrede yapılan bir çalışma sonucuna göre, *lasR* mutanlığı olan 2 *P. aeruginosa* kökeninin sinyal moleküllü üretimlerini, elastaz aktivitelerini, piyosiyenin, ramnolipid ve hidrojen siyanid gibi üretimlerinin QS sistemi kontrolünde olduğu virulans faktör üretimlerini *P. aeruginosa*'nın mutant olmayan tipi ile karşılaştırmışlardır. Sonuçta *lasR* mutanlığı olan kökenlerin sinyal moleküllü üretiminde bozukluk olduğunu ve virulans

faktör üretimlerinin PAO-1 kökenine göre çok düşük düzeyde olduğunu göstermişlerdir (Heurlier ve ark., 2005).

Anuj ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada da, duplex PCR kullanarak *ecfX* ve *gyrB* genlerini çoğaltmışlardır. Çapraz reaktivite sorunları da dahil olmak üzere, tek gen hedeflerini kullanan moleküler tanımlama teknikleri hataya açık olduğu göstermiştir. Hem *ecfX* hem de *gyrB* için pozitif PCR reaksiyonları, *P. aeruginosa* 'nın saptanmasında primer veya prob hedeflerindeki dizi farklılığından kaynaklanan yanlış negatif olasılığını da azaltabilir diye tespit etmişlerdir (Anuj ve ark., 2009).

Daha önce yapılan bir başka çalışmada ise 58 Kistik Fibrozis hastasından alınan 166 *P. aeruginosa* izolatının LasR inaktivasyonu ve mukoid açısından taranması ve karşılaştırılması yapılmıştır. Sonuç olarak, yalnızca ortalama olarak yaklaşık 2 yaş daha genç hastalarda etki gösteren CF'ye uyarlanmış fenotip olmuştur. Regresyon analizinde mukoidinin etkisi benzerlik gösterdi, akciğer fonksiyonunda yaşla birlikte azalma ve lasR mutant enfeksiyonu olan hastalarda olmayanlara göre daha kötü olduğu göstermiştir. *lasR* mutanlığı *P. aeruginosa*'daki kültür pozitifliği, prognostik öneme sahip erken KF adaptif değişikliğinin bir belirteci olarak kabullenmiştir. Ayrıca, *LasR* inhibisyonu antibiyotiklere duyarlılığı değişiklik gösterdiği zaman, *lasR*'de *aeruginosa* mutanlığı ile enfeksiyon tedaviye yanıtı etkileyebileceğini olduğu tespit edilmiştir (Hoffman ve ark., 2009).

Senturk ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada, hastanede yatan hastaların idrar örneklerinden izole edilen 82 *P. aeruginosa* suşunun üretimini, AHL yapısında elastaz, biyofilm, rhamnolipid ve sinyal moleküllerinin üretimini ve QS sistem genlerinin (*lasI*, *lasR*) varlığını araştırmışlardır. Ayrıca *P. aeruginosa* suşlarında, QS sistemi ve üriner sistemin kontrolü altındaki virülens faktörleri ile QS sistemi arasındaki ilişkiyi ortaya koymaya çalışmışlardır. Sonuç olarak, *P. aeruginosa*'nın neden olduğu idrar yolu enfeksiyonlarında ekspresyonu QS sistemi tarafından düzenlenen virülans faktörlerinin rolünü ortaya koyulmuş ve QS sisteminden yoksun izolatların da etken madde olabileceğini düşündürmüştür (Senturk ve ark., 2012).

Türkiye’de yapılan çalışmada, Genellikle hastane enfeksiyonu etkeni olarak değerlendirilen *P. aeruginosa* son dönemlerde toplumdan elde edilen örneklerde de üretilmeye başlanmış olup azımsanmayacak düzeye ulaşmıştır. Antibiyotiklere en yüksek direnç oranı siprofloksasin ve gentamisine karşı saptanırken, imipenem ve meropenem direnç tespit etmiştir. Antibiyotiklere direnç oranlarının artması tedavi sorunlarına ve maliyet yükselmesine neden olmaktadır. Direnç özelliklerinin

belirlenmesine yönelik epidemiyolojik çalışmalar ampirik tedavide klinisyene yol göstermesi açısından yararlıdır. Dolayısıyla hizmet hastanelerinde de bu tip çalışmaların yapılması, her hastanenin o bölgedeki antibiyotik duyarlılıklarını belirlemesi gerek olduğunu önermişlerdir (Coşkun ve Coşkun, 2013).

Türkiye’de yapılan başka bir çalışmada, *P. aeruginosa* klinik izolatlarının antibiyotik duyarlılık profillerini belirlemek amacıyla kullanılan 13 antibiyotik arasında en etkili antibiyotik gurubunun kolistin olduğu ve 3 örneğin bu grup antibiyotiklere karşı dirençli olduğu görülmüştür. Ayrıca izolatların %70’inin antibiyotiklere çoklu direnç gösterdiği tespit edilmiştir. Qurum sensing sistem genlerinin (*lasI*, *lasR*, *rhII*, *rhIR*) tespitinde multipleks PCR yöntemi kullanılmış, örneklerin doğrulanmasında ayrıca *P. aeruginosa* özgü gen kullanılarak genotipik olarak *P. aeruginosa* oldukları doğrulanmıştır. Sonuçta 50 klinik izolatın 4 tanesinde *lasR* geni hariç diğer 4 genin tamamının varlığı tespit edilmişlerdir (Önem ve Ulusoy, 2018).

Başka bir çalışmada ise, Kristal viyole yöntemine göre belirlenen biyofilm üretme kapasitesi sonuçlarına göre dokuz izolatın güçlü biyofilm üretmesi tespit edilmişlerdir. Antibiyotik duyarlılık testi sonuçlarına göre en yüksek direnç imipeneme karşı (%43,4), en düşük direnç ise amikasinine karşı (%14,5) gözlenmiştir (Uzunbayır-Akel ve ark., 2019).

Diğer bir çalışma sonucunda; dikkat çekici bulgu ise orta kuvvetli ve kuvvetli biyofilm oluşturan izolatların tamamında (n= 19) *lasI/lasR* genlerinin keşfedilmesidir. Bu sonuç, olgun bir biyofilm yapısının oluşumunda Las sisteminin gerekliliğini desteklemektedir (Erdal ve ark., 2021).

Çinde 2019 da yapılan bir çalışmada, CIP'nin suşları in vitro seçime dirençli hale getirme konusunda LEV'den daha güçlü olduğu görülmüştür. FQ'ların *P. aeruginosa*'ya karşı moleküler direnç mekanizmaları temel olarak *gyrA* ve *gyrB*'deki mutasyonlardır ve *gyrB*'deki mutasyonlar ilaç direncinde daha önemli bir rol oynamıştır buda bizim çalışmamızın sonuçlarına uyumlu değildir (Feng ve ark., 2019).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Bakteri izolatlarının toplanması ve muhafazası

Çalışma materyelini, Kerkük Hastanelerinde 7-70 yaş arası hastalardan izole edilen ve atık haldeki 125 klinik *Pseudomonas spp* izolatları oluşturmuştur. Bu örneklerin 47' sini idrar, 28' ini kan, 4' ünü balgam, 2' sini yanık, 1' ini Bronşiyal ve 43' üçünü yara enfeksiyonu taşıyan hastalardan toplam 125 örenke alınmış ve *Pseudomonas spp* izole edilmiştir. Bu 125 *Pseudomonas spp* izolatının seçici besiyeri ve vitek ile 50 si *P. aeruginosa* olarak teşhisi edilmiştir. İzolasyonu ve doğrulanması yapılan 50 *P. aeruginosa* suşu çalışma yapılana kadar aşağıda belirtilen şekilde muhafaza edilmiştir.

- **Kısa süreli koruma:** *P. aeruginosa* izolatları tüpte yatık vaziyette olan nutrient agarlı besiyerine ekilerek 12 °C 87 saat bekletilmiştir. Ardından örnekler 4 °C muhafaza edilmiştir (Harly ve Prescott, 2002).
- **Uzun süreli koruma:** % 15 gliserol içeren brain heart infüzyon besiyerine alınan suşlar -20 °C'de saklanmıştır (Vandepitte ve ark., 2003).

3.1.2 Malzemeler ve Kullanılan Besiyelesi

Nutrient Broth

Şirket tarafından belirtilen talimatlara (Oxoid) göre hazırlandı. Otoklavda 121 °C'de 15 dk steril edildi ve 45-50 °C'ye soğutulduktan sonra plaklara döküldü. Vitek 2 sisiteminde bakterilerin antibiyotiklere duyarlılığının araştırılmasında kullanıldı, İzolatların geliştirilmesi ve korunması amacıyla kullanılmıştır.

Setrimid agar

46.7 g Setrimid agar tozu tartıldı ve 990 ml distile suda eritildi. 10 ml gliserol ilave edildi, Su banyosunda 100 °C'de miks yapıldı, Daha sonra otoklavda 121 °C'de 15 dk steril edildi ve 45-50 °C'ye soğutulduktan sonra 15 mg sonar ek madde olarak (Nalidiksik asit) iyice karıştırıldı ve sonra steril kaplara döküldü ve soğutmaya bırakıldı. *Pseudomonas aeruginosa*'nın izolasyonu ve taşhisi için kullanıldı.

Brain Heart infüzyon broth

Üretici firmanın talimatlarına göre hazırlandı ve otoklavda 121 °C’de 15 dk steril edildi. *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarını aktive etmek ve bakterileri birkaç hafta boyunca korumak için kullanıldı.

3.1.3. Kullanılan Kimyasalar

Çizelge 3.1. Kullanılan Malzemeler ve kimyasalar

Kitler	Şirket/ Menşeyi
Mutlak etanol	ROMIL saf kimya, Birleşik Krallık
Kristal mor boya	SYRBIO, İsviçre
%1 glikozlu Mueller-Hinton Broth	Mast Group Ltd., Birleşik Krallık
Fosfat tamponlu salin (PBS) (pH 7.2)	HiMedia, Hindistan
ABIOpure™ Total DNA	ABIOpure, ABD
Agaroz, Ethidium Bromide Solution (10mg/ml), GoTag Green Master Mix, Nükleazsız Su, TAE 40X, Quantifluor dsDNA Sistemi.	Promega, ABD
Mutlak etanol	ROMIL pure chemistry, Birleşik Krallık
Primerler	Macrogen, Kore
Cetrmide agar	Himedia, Hindistan
Brain-Heart infusion broth	Himedia, Hindistan
MacConkey agar	Himedia, Hindistan
Nutrient agar	Himedia, Hindistan
Muller-Hinton agar	Himedia, Hindistan
Tek kullanımlık Petri kapları	Himedia, Hindistan

3.1.4. Kullanılan Cihazlar

VITEK 2

Bu cihaz, *P. aeruginosa* izolatlarını teşhis etmek ve bakterinin antibiyotiklere karşı direnc ve duyarlılığı için kullanıldı.

GloMax® Discover Mikroplaka Okuyucuyu (Promega, ABD)

İzole edilen *P. aeruginosa* örnekleri üzerinde biyofilm analizi tesbit edecek bir cihazdır.



Şekil 3.1. GloMax® Discover Mikroplaka Okuyucuyu (Promega, ABD)

Çizelge 3.2. Kullanılan Cihazlar

Cihaz	Şirket/ Menşeyi
1.5ml, 0.5ml ve 0.2ml Tüp	JET BIOFIL, Singapur
Santrifüj	Fisher Scientific, ABD
Jel Görüntüleme Sistemi	Major Science, Tayvan
Mikro Döndürmeli Santrifüj	My Eugene, Çin
Mikropipet	Human, Almanya
Mikrodalga fırın	GOSONIC, Çin
OWL Elektroforez Sistemi	Thermo, ABD
Quantus florometre	Promega, ABD
Buzdolabı	TEKA, İspanya
Termal ısıt döngüleyici	Thermo Fisher Scientific, ABD
Vortex	Kalite Laboratuvar Sistemi, İngiltere
Su banyosu	Çin
DensiCHEK Plus	Biomerieux, Fransa
Mikropipet	Human, Almanya
GloMax® Discover Mikroplaka Okuyucuyu	Promega, ABD
Kuluçka makinesi/İnkübatör	Çin
Vitek -2 compact sistem	BIOMERIUX, ABD
Uniplex PCR	Bio-Rad, ABD
Incubator	Memmert, Almanya
Hassas Mizan	Sartorius, Almanya
Otoklav	Sakura, Japonya
İphone 14 Promax camera	ABD

3.2. Metot

3.2.1. Bakterilerin izolasyonu

3.2.1.1. Setrimid agar

Toplanan atık durumundaki tüm bakteri örneklerinin, *P. aeruginosa* 'ya seçici kültür ortamı olan Setrmide agara ekildi ve büyüyen bakteriler agar üzerinden izole edildi. Brain Heart infüzyon broth ortamında bakteriler stokları yapıldı.

3.2.1.2. VITEK-2 identifikasyon sistemi

Geleneksel yöntemlerle *P. aeruginosa* olarak tanımlanan izolatların, teşhislerinin doğrulanması VITEK-2 sistemi ile yapıldı (Nakasone ve ark., 2007). VITEK 2, bakteri tanımlaması yapan tam otomatik bir sistemdir (Joyanes ve ark., 2001).

- 1- 5-10 koloni test organizması, 0.50-0.62 McFarland aşılama yoğunluğu verecek şekilde bir pamuklu çubuk kullanılarak 3 ml serum fizyolojik içerisinde süspanse edildi.
- 2- Test organizmasının süspansiyonu VITEK-2 sistemine yüklendi ve her test kartı otomatik olarak bir bakteri süspansiyonu ile dolduruldu ve 6 saat süreyle inkübe edildi. Bu süre zarfında, büyümenin kontrolü için kinetik floresan ölçümü ile her kuyucuk 15 dakikada bir okundu.

3.2.2. Kantitatif Biyofilm Oluşumu Analiz

QS sistemi biyofilm formasyonunu control eder. Ayrıca *las* genlerinin regülasyonu altında ve *rhl* genlerinin ekspresyonu gerçekleşmektedir (Girard ve Bloemberg, 2008). Dolayısıyla izole edilen 47 *P. aeruginosa* örnekleri üzerinde biyofilm analizi yapılmıştır.

3.2.2.1. Aşı hazırlanması

- 1 mL steril salin, şeffaf bir polistiren 12×75 mm test tüpü içine aktarıldı.
- Plakalardan birkaç izole koloni steril pamuklu çubuklar kullanılarak salin tüpüne aktarılarak homojen bir organizma süspansiyonu hazırlandı.
- Süspansiyon, DensiCHEK Plus Metre kullanılarak testin gerektirdiği McFarland standardına ayarlandı.

3.2.2.2. DensiCHEK Plus Metre

Örnekleri okumak üzere DensiCHEK Plus Metreyi kullanmak için:

- Aletin AÇIK olduğundan ve PLASTİK tüp ayarına ayarlandığından emin olundu.
- Bir test tüpünü steril salinle doldurup tüpü alete yerleştirerek DensiCHEK Plus boşaltıldı. “0” tuşuna basarak test tüpü yavaşça döndürüldü. Okuma görüntülenmeden önce bir tam dönüşün tamamlandığından emin olundu. Cihaz, ardından 0.00 olan bir dizi kısa çizgi gösterecektir.
- Okuma tamamlandıktan sonra test tüpün çıkarıldı. Test tüpleri bir dakika sonra yerleştirilmediğinde cihaz otomatik olarak kapanacaktır.

3.2.2.3. Kantitatif Biyofilm Oluşum Testi

İzolatlarının biyofilm oluşturma yeteneği, kristal viyole boyama yöntemine dayanan 96 oyuklu mikrotiter plaka deneyi ile belirlendi. Kısaca, %1 glikoz ile desteklenmiş 199 uL Mueller-Hinton suyu içeren her 96 oyuklu düz tabanlı steril polistiren mikrolaka oluğu, 0.5-0.7 McFarland (1.108 cfu/ml) süspansiyon halindeki bakteriden 1 uL ile aşılandı. Mikroplakalar 24 saat 37°C'de inkübe edilir. Sıvı ortam atıldı ve yapışık hücreler iki kez fosfat tamponlu salinle (PBS) yıkandı ve oyuklar 60°C'de 1 saat veya 1 saatten daha az kurutuldu.

Bundan sonra 15 dakika boyunca 150 uL %2 kristal viyole ile boyandı. Daha sonra mikroplakaların kristal viyole lekeli oyukları, kristal viyole lekesini boşaltmak için iki kez PBS ile yıkandı. Mikroplaka oluklarının hava ile kurutma işleminden sonra, mikroplaka duvarlarını kaplayan biyofilmlerin boyası 150µL %95 etanol ile yeniden çözündürülür. 5-10 dakika sonra mikroplaka, bir mikroplaka okuyucu tarafından 570 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür. Analiz, her seferinde taze örnekler kullanılarak en az üç kez yapıldı (Kerkeni ve ark., 2016) .

Optik yoğunluk eşik değeri (OD_c), aşağıdaki formülde gösterildiği gibi, negatif kontrolün optik yoğunluğunun (OD) ortalamasının üzerinde üç standart sapma olarak belirlendi:

$$OD_c = \text{negatif kontrolün ortalama OD'si} + (\text{negatif kontrolün SD'si} \times 3).$$

Sonuçlar, optik yoğunluklarına göre dört kategoriye ayrıldı:

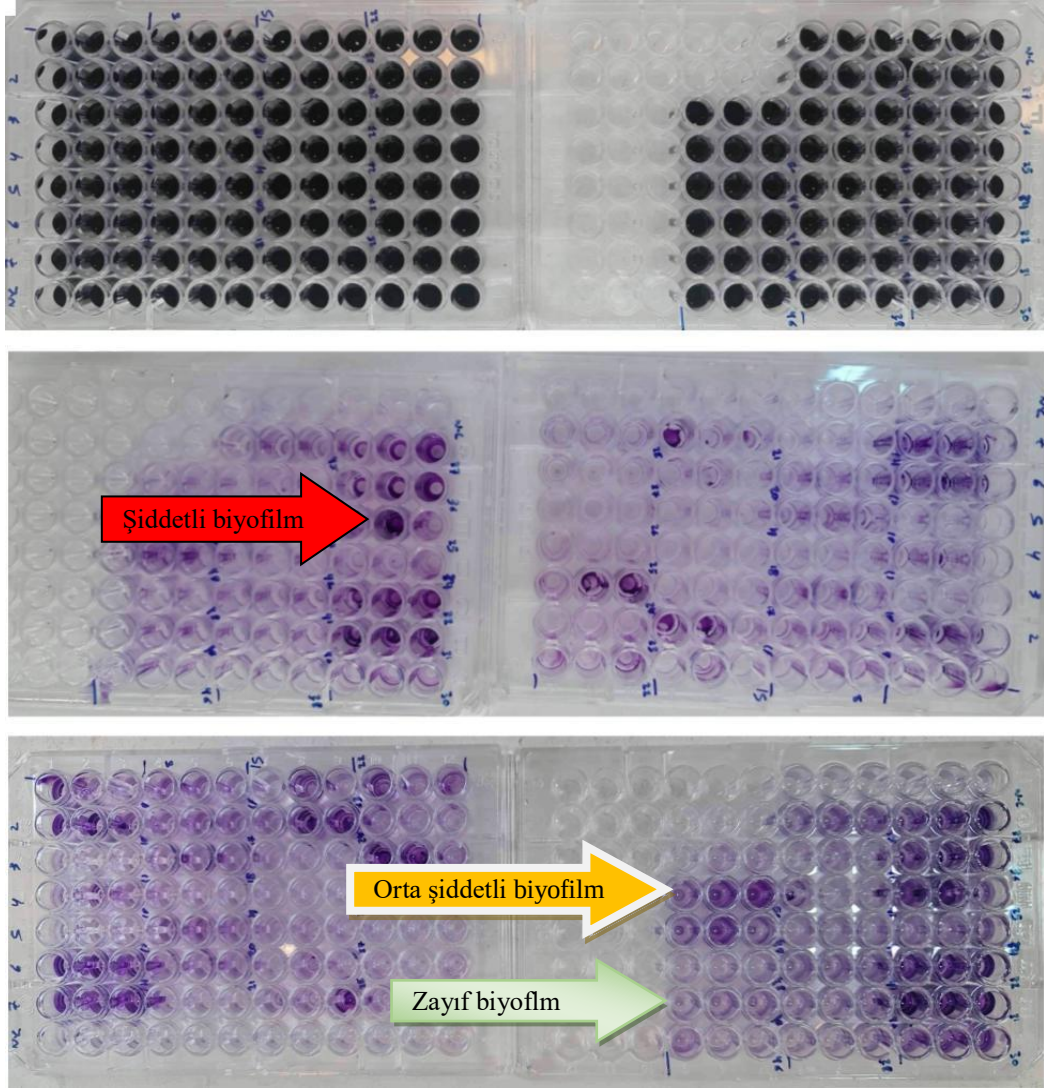
(Boyd ve Chakrabarty) .

(Boyd ve Chakrabarty) güçlü biyofilm üreticisi ($4 \times OD_c < OD$)

(2) orta biyofilm üreticisi ($2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$)

(3) zayıf biyofilm üreticisi ($OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$)

(4) biyofilm olmayan üretici ($OD \leq OD_c$).



Şekil 3.2. Kantitatif Biyofilm Oluşum mikrotiter plaka ELİSA Testi

3.2.3. VITEK-2 kompakt Antibiyotik Duyarlılık Testi (AST)

VITEK-2 kompakt sisteminde, *P. aeruginosa* izolatları duyarlılığını belirlemek için Antibiyotik Duyarlılık Test Kartı (AST C) kullanıldı. Antibiyotik Test Kartında 64 deliğe dağılmış çok sayıda antibiyotik vardır. Cihaz, bakterilerin büyümesini takiben

bulanıklık değişikliklerini kaydeder. Bütün işlemler üretici firmanın (BioMerieux) talimatlarına göre yapıldı (Pincus, 2006).



Şekil 3.3 VITEK-2 kompakt sistem

Çalışma yöntemi:

- 1- Tüm bakteri izolatları MacConkey agar üzerine yayıldı ve 24 saat ve 37 °C’de inkübe edildi.
- 2- Duyarlılığı incelemek için Khan Tüpü alınmış ve 3 ml normal tuz çözeltisi eklenmiş ve daha sonra tek bir koloniden alınarak Khan Tüpüne konuldu. VITEK Densicheck cihazı ve süspansiyon bulanıklığı 0.63-0.50 ayarlandı.
- 3- AST kartı Khan Tüpüne yerleştirildi ve cihaza yerleştirilmek üzere özel bir tutucuya sabitlendi.
- 4- Numuneyi Khan tüpünden AST Karta aktarmak için doldurma kapağına yerleştirildi. Numuneler daha sonra 37 °C’de inkübe edilecek yükleme kapağına manuel olarak aktarıldı. Antibiyotik duyarlılık testi sonuçları 12-16 saat arasında verilir. Daha sonra, inkübatörde bulunan her bir AST kartı için BioMerieux talimatlarına göre antibiyotik duyarlılık testi raporu yazdırıldı

3.2.4. Bakterilerin genetik çalışmaları

3.2.4.1. DNA Ekstraksiyonu

Genomik DNA, aşağıdaki adımlarda olduğu gibi ABIOpure Ekstraksiyon protokolüne göre izole edildi:

- 13000 rpm'de 2 dakika boyunca 1 mL gece kültürü. Süpernatant daha sonra atıldı.
- Hücre Paleti 200µl Tampon CL içinde tamamen yeniden süspanse edildi.
- Protein sindirimi ve hücre lizisi için 200 µl Tampon CL ve hücre peletine 20 µl Proteinase K solüsyonu (20 mg/ml) ilave edildi, ardından tüp vorteksle kuvvetlice karıştırıldı ve 56°C'de 30 dakika inkübe edildi, daha fazla lizis için 30 dakika 70°C'de inkübe edildi.
- Numuneyi, puls-vorteksi iyice karıştırmak için numuneye absolü etanolden 200µl eklendi.
- Tüm karışımlar dikkatli bir şekilde mini kolona aktarıldıktan sonra 6.000 x g'nin üzerinde (>8.000 rpm) 1 dakika santrifüj edildi ve toplama tüpü yenisi ile değiştirildi.
- Tampondan BW 600µl mini kolona eklendi, daha sonra 6.000 x g'nin üzerinde (>8.000 rpm) 1 dakika santrifüjlendi ve toplama tüpü yenisiyle değiştirildi.
- Tampondan TW 700µl uygulandı. 6.000 x g'nin üzerinde (>8.000 rpm) 1 dakika santrifüjlendi. Geçiş atıldı ve mini kolon tekrar toplama tüpüne yeniden yerleştirildi.
- Mini kolon, kalan yıkama tamponunu çıkarmak için 1 dakika boyunca tam hızda (>13.000 x g) Santrifüjlendi, ardından mini kolon yeni bir 1.5 ml'lik tüpe yerleştirildi.
- Tampondan AE 100µl ilave edildi ve 1 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi, ardından 5.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi.

3.2.4.2. DNA Kantitasyonu/Miktar tayini

İzole edilen DNA konsantrasyonunu tespit etmek için Quantus Fluorometer kullanıldı. 1 µl DNA için 200 µl seyreltilmiş Quantifluor Dye karıştırıldı. Oda sıcaklığında 5 dakikalık inkübasyonun ardından DNA konsantrasyon değerleri tespit edildi.

3.2.4.3 Primer hazırlama

Bu çalışmada, kullanılacak *lasI*, *lasR* ve *gyrB* genlere ait olan primerler tablo 2 verilmiştir (Qin ve ark., 2003)

Çizelge 3.3. QS, *gyrB* genlerini belirlemek için Kullanılan primirler

PrimerAdı	Dizi 5'-3'	Tavlama Sıcaklığı (C)	Ürün Boyutu (bp)
<i>lasI</i> -F	ATGATCGTACAAATTGGTCGG	57	605
<i>lasI</i> -R	GTCATGAAACCGCCAGTC	57	
<i>lasR</i> -F	ATGGCCTTGTTGACGGT	57	725
<i>lasR</i> -R	GCAAGATCAGAGAGTAATAAGACCC	57	
<i>gyrB</i> -F	CCTGACCATCCGTCGCCACAA	57	222
<i>gyrB</i> -R	CGCAGCAGGATGCCGACGCC	57	

Çizelge 3.4. Primer hazırlama

Primer Adı	Nükleaz içermeyen su hacmi (µl)	Konsantrasyon (pmol/µl)
<i>lasI</i> -F	300	100
<i>lasI</i> -R	300	100
<i>lasR</i> -F	300	100
<i>lasR</i> -R	300	100
<i>gyrB</i> -F	300	100
<i>gyrB</i> -R	300	100

Bu primerler, Macrogen Company tarafından liyofilize formda sağlandı. Liyofilize primerler, bir stok çözelti olarak 100 pmol/ul'lik bir nihai konsantrasyon verecek şekilde nükleaz içermeyen bir suda çözdürüldü. Bu primerlerin bir çalışma solüsyonu, 10pmol/µl'lik bir çalışma primer solüsyonu elde etmek için 90µl nükleaz içermeyen suya 10µl primer stok solüsyonu (-20°C'de saklanan) eklenerek hazırlandı.

3.2.4.4 Reaksiyon Kurulumu ve Termal Döngü Protokolü

Çizelge 3.5. Bileşen Hesaplaması

Reaksiyon Sayısı	30	Rxn	Primerlerin Bağlanma Sıcaklığı	57 °C
Reaksiyon Hacmi /çalışma	20	µl	PCR Döngü Sayısı	30 °C

Çizelge 3.6. PCR reaksiyon içeriği

5 Ana karışım bileşenleri	Stok	Birim	Nihai	Birim	Hacim
					1Numune
Ana karışım (Master mix)	2	X	1	X	10
İleri Primer (Forward primer)	10	µM	0.5	µM	1
Ters Primer (Reverse primer)	10	µM	0.5	µM	1
Nükleazsız Su					6
DNA		ng/µl		ng/µl	2
Toplam Hacim					20
Her bir tek rxn başına alikuot	Tüp başına 18µl Master karışımı ve 2µl mastar ekleyin				

3.2.4.5. PCR Programı

Çizgele 3.7. PCR Program

Adımlar	°C	m:s	Döngü
Başlangıç Denatürasyonu	95	05:00	1
Denatürasyon	95	00:30	30
Tavlama	57	00:30	
Uzatma	72	00:30	
Nihai uzatma	72	07:00	1
Tutma	10	10:00	



Şekil 3.4. PCR cihazı

3.2.5. Agaroze Jel Elektrofözezi

PCR amplifikasyonundan sonra, amplifikasyonun varlığını doğrulamak için agaroze jel elektrofözezi uygulandı. PCR, ekstrakte edilen DNA kriterlerine tamamen güvenilirildi.

3.2.5.1. Solüsyonlar

1 X TAE tamponu, yükleme boyası, DNA basamağı işaretleyici, Ethidium bromide (10mg/ml).

3.2.5.2. Agaroze hazırlığı

- 100 ml 1X TAE şişeye alındı.
- Tampona 1,5 gr (%1,5 için) agaroze eklendi.
- Çözelti, tüm jel parçacıkları çözülene kadar (Mikrodalga kullanılarak) kaynama noktasına kadar ısıtıldı.
- Agaroze 1 µl Ethidium Bromide (10mg/ml) eklendi.
- karışımı elde etmek ve baloncuk oluşmaması için Agaroze karıştırılır.

- Çözelti 50-60°C'de soğumaya bırakıldı.

3.2.5.3. Yatay agaroz jelin dökümü

Her iki kenarı da selofan bantlarla kapatıldıktan sonra agaroz solüsyonu jel tepsisine döküldü ve agaroz oda sıcaklığında 30 dakika katılaşmaya bırakıldı. Tarak dikkatlice çıkarıldı ve jel, jel tepsisine yerleştirildi. Tepsi, tampon jel yüzeyinin 3-5 mm üzerine ulaşana kadar 1X TAE elektroforez tamponu ile dolduruldu.

3.2.5.4. DNA yükleme

PCR ürünleri doğrudan yüklendi. PCR ürünü için 5µl doğrudan oluğa yüklendi. Elektrik gücü 60 dakika boyunca 100v/mAmp'ta açıldı. DNA, Katottan artı Anot kutuplarına hareket eder. Jeldeki Ethidium bromit lekeli bantlar, Jel görüntüleme sistemi kullanılarak görüntülendi.

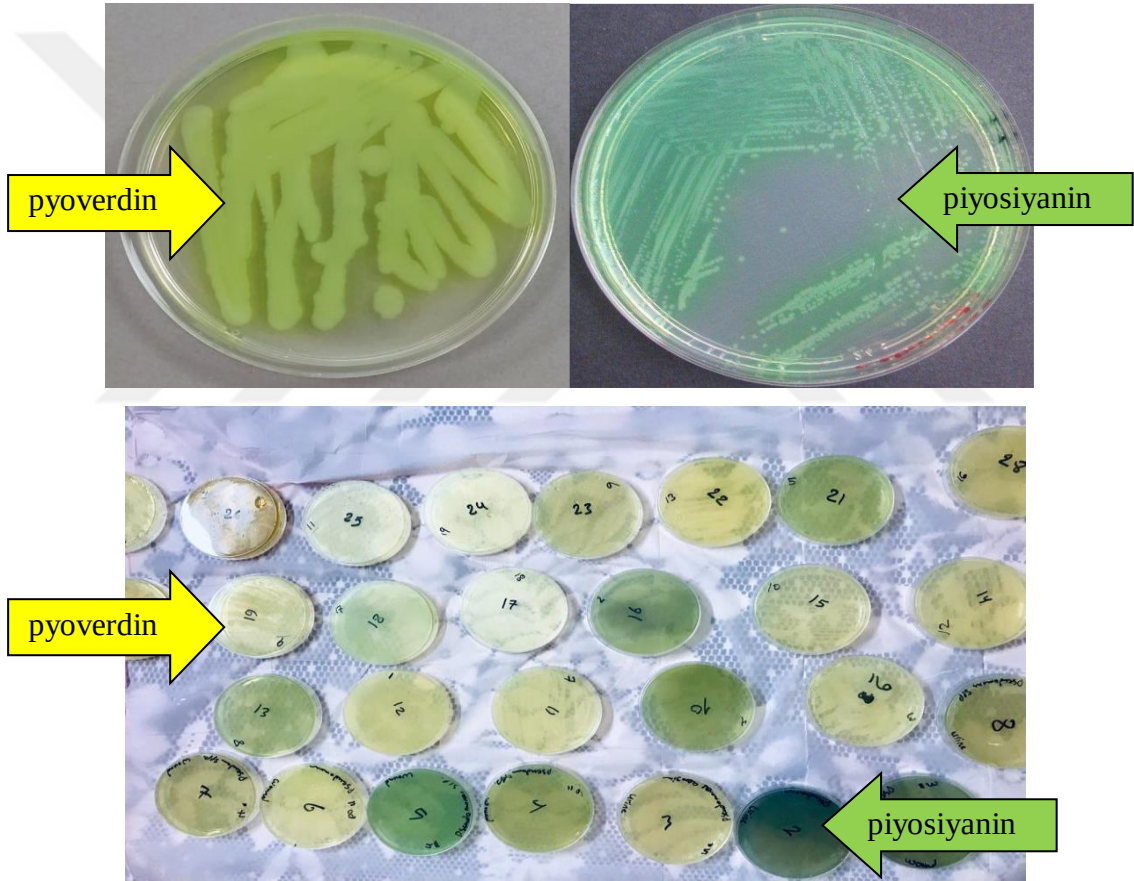
3.2.5.5. İstatistiksel Analiz Yöntemleri

Odc biyofilm isolat verilerinin öncelikle hem antibiyotik duyarlılığı hem de şiddet grubuna göre dağılımının normal dağılıma uygunluğunu test etmek için kullanılan Shapiro-Wilks Testi sonucuna göre verilerin dağılımının normal dağılıma uymadığı istatistiki olarak kabul edildi ($p < \alpha = 0,05$). Odc biyofilm isolatın antibiyotik duyarlılığına göre farklılığını test etmek için Mann-Whitney U testi, şiddet grubuna göre farklılığını test etmek için Kruskal-Wallis testi kullanıldı. Antibiyotik Duyarlılığı ile Biyofilm Şiddeti arasındaki ilişki olup olmadığını test etmek için Yates Düzeltmeli Ki-Kare Testi uygulandı. Sütun grup oranları arasındaki fark için Compare column proportion z-Test (Bonferroni method) uygulandı. Analizler %5 anlam seviyesinde (%95 güven seviyesinde) değerlendirildi. SPSS 21 Programı kullanıldı. Ayrıca 30 izolattan 29'unda *Q.S* genleri ve *gyrB* geni saptandığı nedeniyle istatistiksel analiz yapılmamıştır.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. *P. aeruginosa*'nın İzolasyonu ve Teşhisi

2022 yılının Kasım, Aralık ve 2023 Ocak ayları arasında Kerkük Hastanelerinden 7-70 yaşları arasındaki atık halde olan yara, yanık, kan, balgam, idrar ve bronşiyal örneklerini içeren numunelerin morfolojik, biyokimyasal testler sonucunda 125 *Pseudomonas spp.* olarak belirlenmiştir. Bu izolatlar *P. aeruginosa*'ya özgü seçici besi ortamı olan setrimid agar (Şekil 4.1) ve daha kantitatif sonuçlar ortaya koyan ve identifikasyonda oldukça ileri düzeyde otomatize bir sistem olan VITEK-2 ile yapılan doğrulama testinde sadece 50 izolatın belli bir indeksin üzerinde *P. aeruginosa* olduğu tesbit edilmiştir.



Şekil 4.1. *Pseudomonas aeruginosa*'nın setrimid agar üzerindeki koloni görünümü

Bu VITEK-2 sonuçlarına göre; kan örneklerinden 4 (% 8), yara örneklerinden 28 (% 56), idrar örneklerinden 16 (% 32), balgam örneklerinden 2 (% 4), bronşiyal örneklerinden 1 (% 2) ve yanık örneklerinden 1 (% 2) olmak üzere 50 *P. aeruginosa* izolatı elde edilmiştir. Bu 50 *P. aeruginosa* suşunun izole edildiği kaynağına göre dağılımı Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. İzolasyon kaynağına göre *P. aeruginosa* izolatlarının sayısı ve yüzde oranları

İzolasyon Kaynağı	Atık Örnek Sayısı (%)	Vitek-2 sonucu <i>P. aeruginosa</i> İzolat Sayısı (%)
Kan	28 (%22.4)	4 (%8)
Yara	43 (%34.4)	28 (%56)
İdrar	47 (%37.6)	16 (%32)
Balgam	4 (%3.2)	2 (%4)
Yanık	2 (%1.6)	1 (%2)
Bronşiyal	1 (%0.8)	1 (%2)
Toplam	125 (%100)	50 (%100)

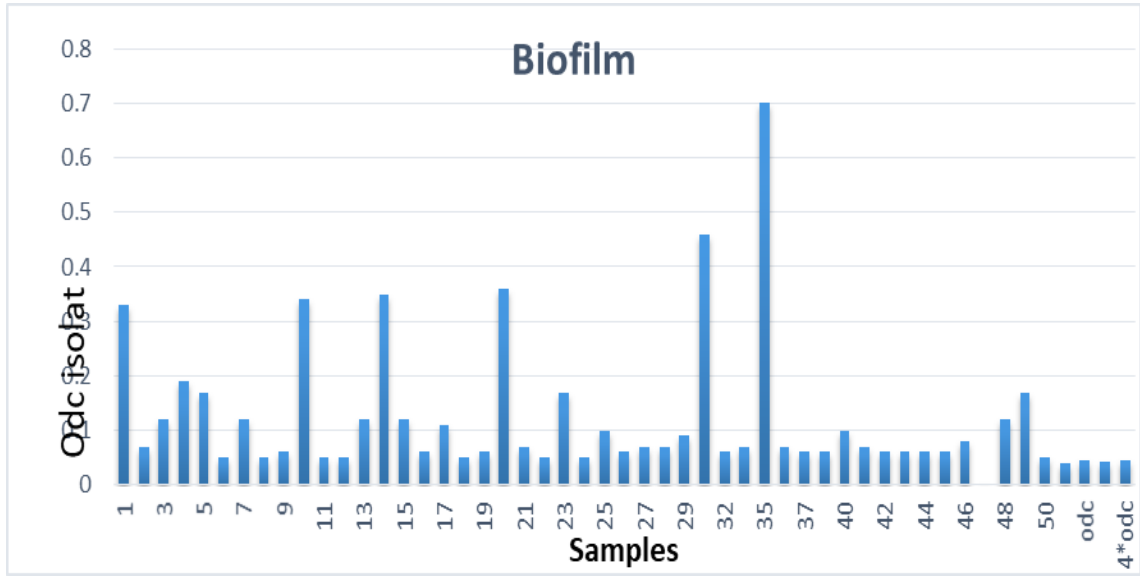
4.2. Kantitatif Biyofilm Oluşumu sonuçları

Biyofilm yapımı yönünden çalışmaya alınan suslar incelendiğinde PAO-1'in biyofilm absorbans değerlerine göre, toplam 50 adet *P. aeruginosa* izolatının 3'ü kontaminasyondan dolayı çalışmaya dahil edilmemiştir. Geri kalan 47 örneğin kantitatif ELİSA biyofilm test sonuçlarına göre % 2.2'sinin (1 izolat) negatif, %97.8'nin (46 izolat) pozitif olduğu görülmüştür. Ayrıca pozitif olan sonuçların %10.6'nın şiddetli, %23.4'nin orta şiddetli ve %63.8'nin zayıf şiddetli biyofilm ürettiği gözlemlenmiştir. Şiddet düzeyi Glomax cihaz sonuçlarından elde edilen grafikteki 0-0.20 arası zayıf şiddetli 0.20-0.30 arası orta şiddetli ve 0.30'dan fazlası şiddetli biyofilm oluşturduğu kabul edilmiştir (Kerkeni ve ark., 2016),(Çizgele 4.4),(Şekil 4.8).

Çizgele 4.2. Kantitatif Biyofilm Oluşumu sonuçları

Sample	OD1	OD2	OD3	Ave.	Odc isolat	odc	2*odc	4*odc	Results
1	0.33	0.31	0.35	0.33	0.33	0.05	0.10	0.19	3
2	0.06	0.07	0.07	0.07	0.07	0.05	0.10	0.19	1
3	0.13	0.12	0.12	0.12	0.12	0.05	0.10	0.19	2
4	0.22	0.20	0.15	0.19	0.19	0.05	0.10	0.19	2
5	0.15	0.18	0.17	0.17	0.17	0.05	0.10	0.19	2
6	0.05	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.10	0.19	1
7	0.11	0.13	0.12	0.12	0.12	0.05	0.10	0.19	2
8	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.10	0.19	1
9	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.05	0.10	0.19	1
10	0.37	0.31	0.33	0.34	0.34	0.05	0.10	0.19	3

11	0.05	0.05	0.06	0.05	0.05	0.05	0.10	0.19	1
12	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.10	0.19	1
13	0.11	0.17	0.09	0.12	0.12	0.05	0.10	0.19	2
14	0.33	0.33	0.39	0.35	0.35	0.05	0.10	0.19	3
15	0.15	0.10	0.12	0.12	0.12	0.05	0.10	0.19	2
16	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.05	0.10	0.19	1
17	0.06	0.06	0.21	0.11	0.11	0.05	0.10	0.19	2
18	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.10	0.19	1
19	0.05	0.06	0.06	0.06	0.06	0.05	0.10	0.19	1
20	0.34	0.37	0.37	0.36	0.36	0.05	0.10	0.19	3
21	0.07	0.07	0.08	0.07	0.07	0.05	0.10	0.19	1
22	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.10	0.19	1
23	0.21	0.16	0.15	0.17	0.17	0.05	0.10	0.19	2
24	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.10	0.19	1
25	0.11	0.10	0.10	0.10	0.10	0.05	0.10	0.19	2
26	0.05	0.06	0.06	0.06	0.06	0.05	0.10	0.19	1
27	0.07	0.08	0.07	0.07	0.07	0.05	0.10	0.19	1
28	0.07	0.07	0.08	0.07	0.07	0.05	0.10	0.19	1
29	0.11	0.09	0.08	0.09	0.09	0.05	0.10	0.19	1
30	0.48	0.52	0.38	0.46	0.46	0.05	0.10	0.19	3
32	0.06	0.06	0.07	0.06	0.06	0.05	0.10	0.19	1
34	0.08	0.07	0.07	0.07	0.07	0.05	0.10	0.19	1
35	0.77	0.75	0.59	0.70	0.70	0.05	0.10	0.19	1
36	0.06	0.09	0.05	0.07	0.07	0.05	0.10	0.19	1
37	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.05	0.10	0.19	1
38	0.07	0.06	0.06	0.06	0.06	0.05	0.10	0.19	1
40	0.09	0.10	0.10	0.10	0.10	0.05	0.10	0.19	2
41	0.07	0.08	0.07	0.07	0.07	0.05	0.10	0.19	1
42	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.05	0.10	0.19	1
43	0.07	0.06	0.06	0.06	0.06	0.05	0.10	0.19	1
44	0.06	0.08	0.06	0.06	0.06	0.05	0.10	0.19	1
45	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.05	0.10	0.19	1
46	0.07	0.07	0.10	0.08	0.08	0.05	0.10	0.19	1
47	0.05	0.05	0.05	0.05	0.00	0.05	0.10	0.19	0
48	0.13	0.13	0.11	0.12	0.12	0.05	0.10	0.19	1
49	0.15	0.21	0.17	0.17	0.17	0.05	0.10	0.19	2
50	0.05	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.10	0.19	1
NC	0.04	0.04	0.05	0.04	0.04	0.05	0.10	0.19	0



Şekil 4.2. Kantitatif Biyofilm Oluşumu sonuçları çizgelesi

4.3. *P. aeruginosa* İzolatlarının Antibiyotiklere Karşı Direnci

Çalışma kapsamında mikrobiyoloji biriminde rutin yapılan antibiyogram sonuçlarına göre antibiyotiğe dirençli 50 *P. aeruginosa* izolatından 30'u birçok antibiyotiğe dirençli (MDR) olduğundan hedef alındı ve çalışmalar bu 30 izolat üzerinden devam edildi.

4.3.1 VITEK-2 Sistemi ile Antibiyotiklerin Duyarlılık Testi

Çoklu ilaca dirençli (MDR) *P. aeruginosa*, penisilinler, sefalosporinler, monopaktam, karbapenemler, florokinolonlar ve aminoglikozitlerden oluşan üç veya daha fazla antibiyotik grubuna dirençli izolat olarak tanımlanır (Dash ve ark., 2014).

Birçok antibiyotiğe direnci (MDR) ile dikkat çeken 30 *P. aeruginosa*'nın, β -lactamases, Aminoglikozitler, Florokinolonlar/Quinolones, Polimiksin antibiyotik guruplarını kapsayan toplam 37 antibiyotik duyarlılık testleri VITEK-2 kullanılarak yapılmıştır. Çalışılan tüm izolatlar antibiyotiklere karşı çoklu direnç göstermiştir (Çizelge 4.3.1.). Toplam 30 izolattan 18'i (% 60) 31 antibiyotiğe % 100 direnç gösterirken, 12'si (% 40) nisbeten daha az direnç göstermiştir. En az direnci %70 oranında amikasin antibiyotiği göstermiştir (Çizelge 4.3.).

Çizgele 4.3. Vitek-2 kullanılarak izole edilen *P. aeruginosa* bakterilerine karşı kullanılan bazı antibiyotiklere direnç, orta duyarlı ve duyarlılık oranları.

Antibiyotikler	Direnç %	Orta Duyarlı %	Duyarlı %
β-lactamases			
A. Penselinler			
Amoksisilin	% 100	% 0	% 0
Ampisilin	% 100	% 0	% 0
Karbenisilin	% 100	% 0	% 0
Piperasilin	% 100	% 0	% 0
Tikarsilin	% 90	% 0	% 10
Azlosilin	% 100	% 0	% 0
B. Penisilin kombinasyonu			
Tikarsilin / klavulanik asit	% 80	% 0	% 20
Piperasilin/ Tazobaktam	% 100	% 0	% 0
Ampisilin/ Sulbaktam	% 100	% 0	% 0
Amoksisilin / Klavulanik asit	% 100	% 0	% 0
C. Sefalosporinler			
Sefsulodin	% 100	% 0	% 0
Seftarolin	% 100	% 0	% 0
Seftobeprol	% 100	% 0	% 0
Sefaklor	% 100	% 0	% 0
Sefadroksil	% 100	% 0	% 0
Sefalaksin	% 100	% 0	% 0
Sefazolin	% 100	% 0	% 0
Sefradin	% 100	% 0	% 0
Sefamandol	% 100	% 0	% 0
Sefuroksim	% 100	% 0	% 0
Sefmetazol	% 100	% 0	% 0
Sefotetan	% 100	% 0	% 0
Sefoksitin	% 100	% 0	% 0
Sefditoren	% 100	% 0	% 0
Sefiksim	% 100	% 0	% 0
Sefotaksim	% 100	% 0	% 0
Seftriakson	% 100	% 0	% 0
D. Monobaktamlar			
Aztreonam	% 100	% 0	% 0
C. Karbapenem			
İmipenem	% 100	% 0	% 0
Meropenem	% 100	% 0	% 0

Aminoglikozitler			
Amikasin	% 70	% 0	% 30
Gentamisin	% 90	% 10	% 0
Tobramisin	% 100	% 0	% 0
Florokinolonlar/ Quinolones			
Siprofloksasin	% 80	% 0	% 20
Levofloksasin	% 80	% 0	% 20
Sinoksasin	% 100	% 0	% 0
Polimiksin			
Kolistin	% 100	% 0	% 0

4.3.2. Biyofilm ve MDR arasındaki Korelasyon Rezistans

Çoklu antibiyotik direncinin (MDR) nedenleri, bakterilerin çok sayıda virülans faktörüne sahip olmasından kaynaklanmaktadır. *P. aeruginosa*'da biyofilm üretimi, birçok ilaca karşı direnç oluşturan en önemli virülans faktörlerinden biridir. Bu çalışmada çoklu ilaç direnci gösteren tüm 30 izolattın hepsinde (%100'de) biyofilm oluşumu görülmüştür. Toplam 30 izolattan 18'i (% 60) 31 antibiyotiğe % 100 direnç gösteren izolatların 5'i (%16.3'ünün) Şiddetli biyofilm , 9'ü (%30) Orta Şiddetli Biyofilm oluşturan izolatlar ve 4'ü (%10) Zayıf Biyofilm oluşturan izolatlar belirlenmiştir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Biyofilm Oluşumu, Çoklu İlaç (MDR) Arasındaki Korelasyon Rezistans

Biyofilm Antibiyotik Duyarlılığı	Şiddetli Biyofilm 10 % (n) 3	Orta Şiddetli Biyofilm 6.6 % (n) 2	Zayıf Şiddetli Biyofilm 83.4 % (n) 25	Toplam 100 % (n) 30
MDR 100 % 18 suş	5 % 16.7	9 % 30	4 % 10	18 % 60
Diğer 12 suş	0 % 0.0	0 % 0.0	12 % 43.3	12 % 40

Çizelge 4.5. Çoklu İlaç direnci (MDR) örneklerden izole edilen susların biyofilm yapım şiddeti

Örnek sayısı	Odc isolat	Biyofilm Şiddeti Sonuçları	Antibiyotik Duyarlılığı
1	0.33	3	MDR %100
2	0.07	1	Diğerleri
3	0.12	2	MDR %100
4	0.19	2	MDR %100

5	0.17	2	MDR %100
6	0.05	1	Diğerleri
7	0.12	2	MDR %100
8	0.05	1	Diğerleri
9	0.06	1	Diğerleri
10	0.34	3	MDR %100
11	0.05	1	MDR %100
12	0.05	1	Diğerleri
13	0.12	2	MDR %100
14	0.35	3	MDR %100
15	0.12	2	MDR %100
16	0.06	1	Diğerleri
17	0.11	2	MDR %100
18	0.05	1	Diğerleri
19	0.06	1	Diğerleri
20	0.36	3	MDR %100
21	0.07	1	MDR %100
22	0.05	1	Diğerleri
23	0.17	2	MDR %100
24	0.05	1	MDR %100
25	0.1	2	MDR %100
26	0.06	1	Diğerleri
27	0.07	1	MDR %100
28	0.07	1	Diğerleri
29	0.09	1	Diğerleri
30	0.46	3	MDR %100

Yates Düzeltmeli Ki-Kare Test sonucuna göre antibiyotik duyarlılığı ile biyofilm şiddeti arasındaki ilişki istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur. ($p < \alpha = 0,05$).

Sütun grup oranları arasındaki farka ilişkin test sonuçları tabloda verilmiştir. Aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki fark istatistiki olarak anlamlı değilken farklı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki fark istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur.

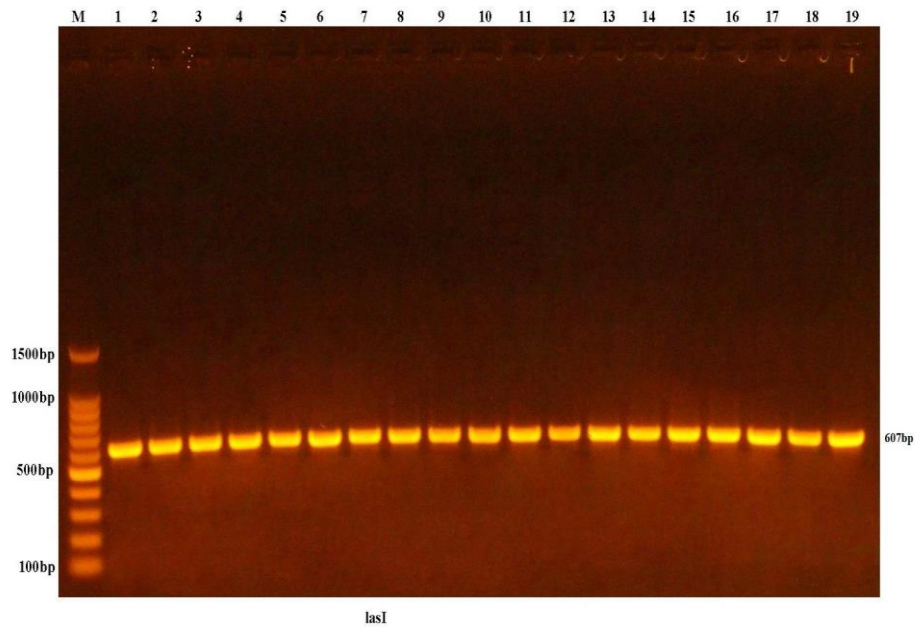
Çizgele 4.6. Biyofilm şiddet grupları ve MDR 100% ve diğerleri arasındaki istatistiksel analizi

			Biyofilm Şiddet		
			Orta+Şiddetli	Zayıf	Toplam
Antibiyotik Duyarlılığı	MDR %100	n	14 _a	4 _b	18
		%	77,8%	22,2%	100,0%
	Diğerleri	n	0 _a	12 _b	12
		%	0,0%	100,0%	100,0%
Toplam			n	14	30
			%	46,7%	53,3%

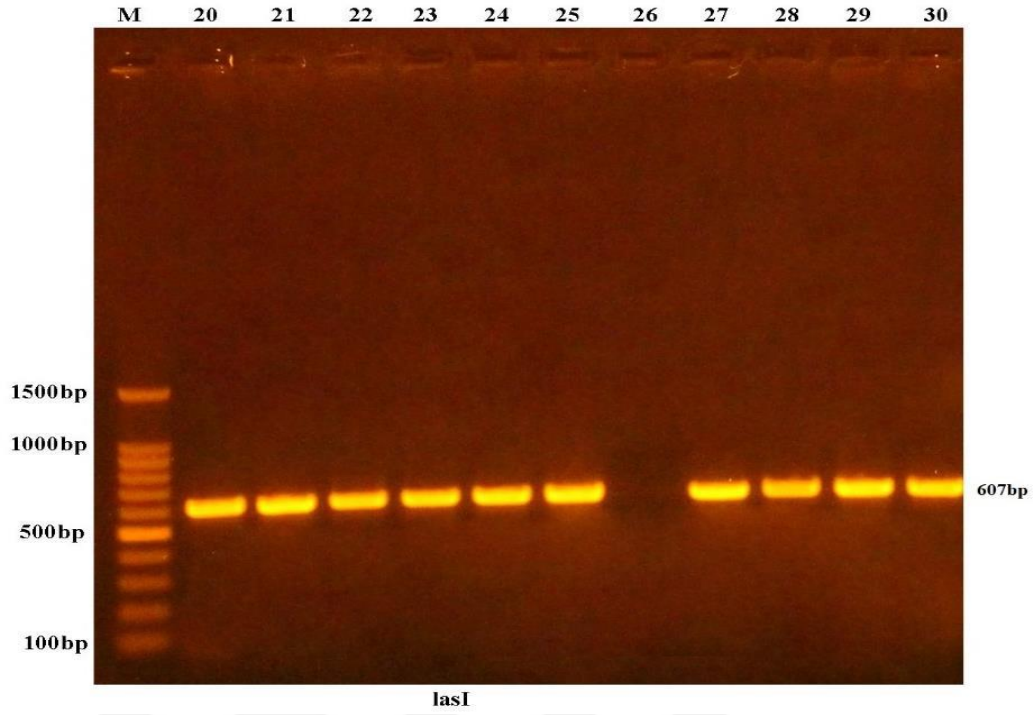
4.4. PCR Amplifikasyonu

4.4.1. QS genleri *lasI*, *lasR* belirlenmesi sonuçları

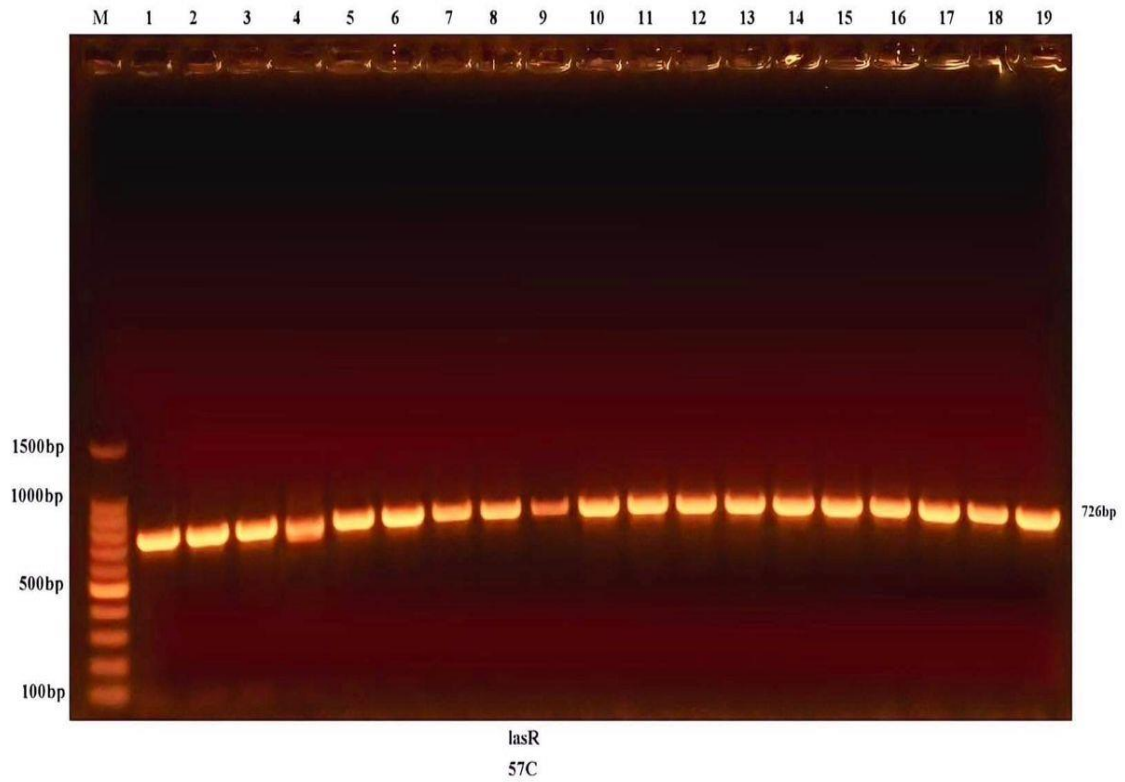
Çalışmada kullanılan *P. aeruginosa* klinik izolatların Q.S sistemlerinin fonksiyonel olup olmadığını belirlemek için, unipleks PCR yapılarak *lasI*, *lasR* genleri çoğaltılmış ve çoğaltılan ürünler %1'lik agaroz jelde ayrıştırılıp etidyum bromür ile boyandıktan sonra jel görüntüleme cihazında UV ışık altında görüntülenmiştir. PCR analizi sonucunda 30 klinik izolatın 29'sunda ve PA01 suşunda *lasI* (607 bp), *lasR* (726 bp) Q.S sistemi genlerinin mevcut olduğu görülmüştür. 26 nolu suş %80 MDR ve zayıf biyofilm üretmesine rağmen QS *lasI*, *lasR* genleri ve *gyrB* direnç geni negatif çıkmıştır (Şekil 4.3, 4.4, 4.5, 4.6).



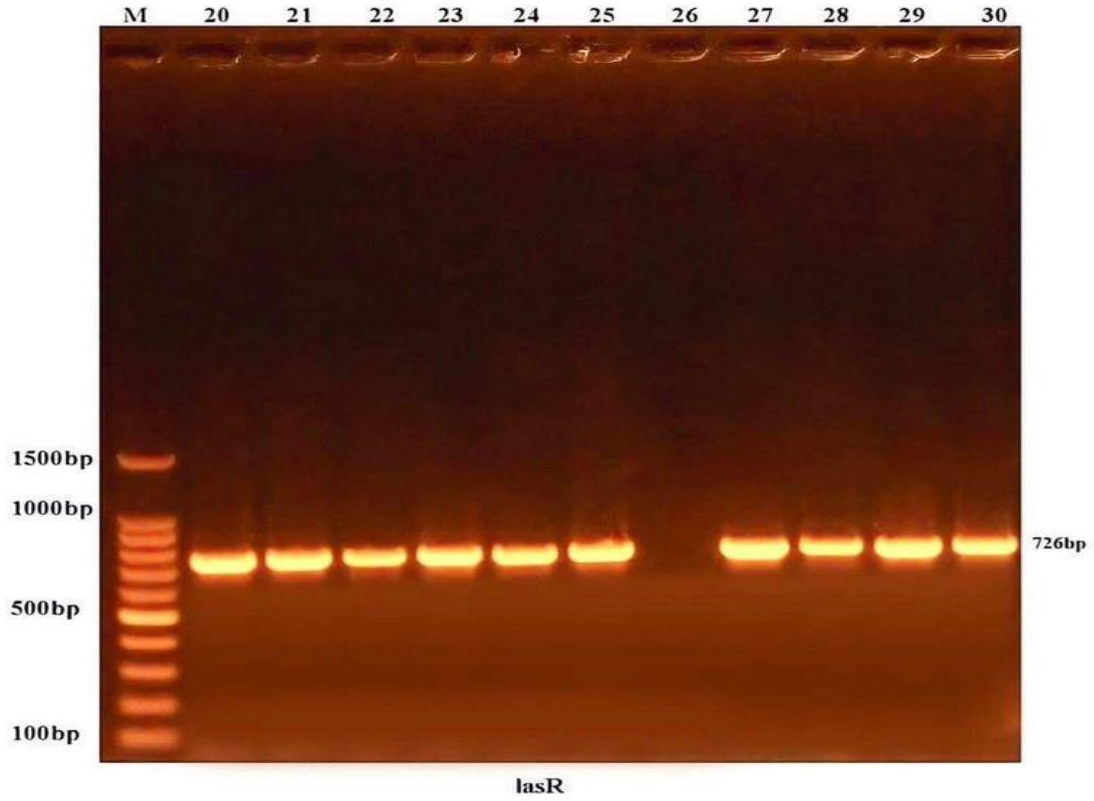
Şekil 4.3. *Pseudomonas aeruginosa* örneklerinin *LasI* geninin amplifikasyon sonuçlarının %1.5 agaroz jel elektroforezi. Eth.Br M: 100bp, Agarose, LE, Analytical Grade, Promega ABD.



Şekil 4.4. *Pseudomonas aeruginosa* örneklerinin *LasI* geninin amplifikasyon sonuçlarının %1.5 agaroz jel elektroforezi. Eth.Br M: 100bp, Agarose, LE, Analytical Grade, Promega ABD.



Şekil 4.5. *Pseudomonas aeruginosa* örneklerinin *LasR* geninin amplifikasyon sonuçlarının %1.5 agaroz jel elektroforezi. Eth.Br M: 100bp, Agarose, LE, Analytical Grade, Promega ABD.



Şekil 4.6. *Pseudomonas aeruginosa* örneklerinin *LasR* geninin amplifikasyon sonuçlarının %1.5 agaroz jel elektroforezi. Eth.Br M: 100bp, Agarose, LE, Analytical Grade, Promega ABD.

4.4.2. QS Genlerinin Varlığı ile Biyofilm Düzeylerine Göre Dağılımı

P.aeruginosa'da biyofilm oluşumunu da içeren birçok virülans faktörü üretiminin düzenlenmesinde QS'nin görev aldığı bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda, özellikle biyofilmin yapılanma, olgunlaşma ve dağılma aşamalarında QS sisteminin rolü açıkça gösterilmiştir (Pérez-Pérez ve ark., 2017; Maurice ve ark., 2018).

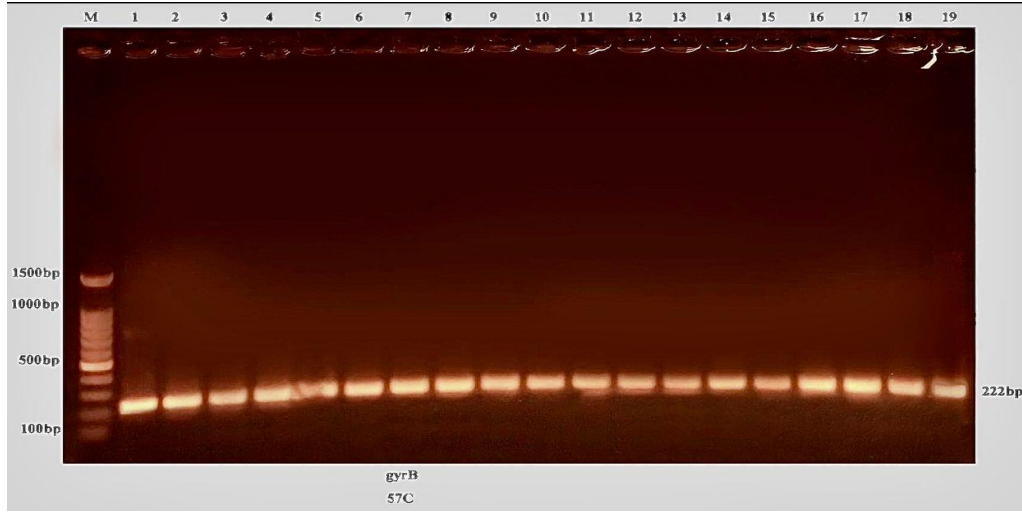
Bu çalışmada 29 izolatın QS genlerinin varlığı ile biyofilm şiddeti arasındaki ilişkileri ve dağılımı çizelge 4.5. gösterilmiştir. *lasI*, *lasR* genleri bakımından pozitif toplam 29 izolatta 5'inde şiddetli biyofilm, 9'unda orta şiddetli biyofilm ve 15'inde zayıf şiddetli biyofilm görülmüştür (Çizgele 4.5).

Çizgele 4.7. QS Genleri Varlığının Biyofilm Düzeylerine Göre Dağılımı

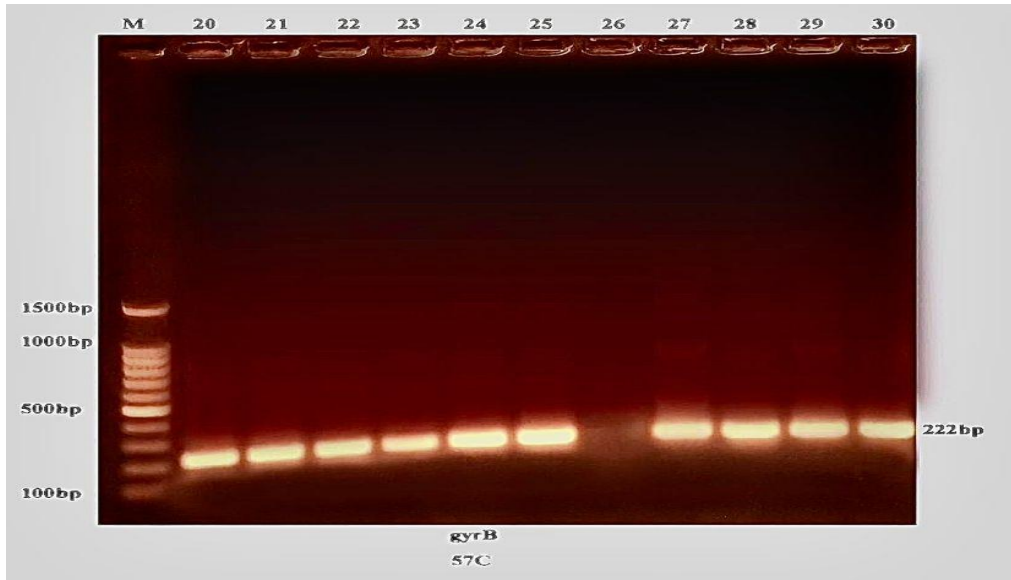
Biyofilm QS Genleri	Şiddetli Biyofilm (n)	Orta Biyofilm	Zayıf Biyofilm	Toplam
<i>lasI, lasR</i>	5	9	15	29

4.4.3. *gyrB* geni belirlenmesi sonuçları

FQ'ların *P. aeruginosa*'ya karşı moleküler direnç mekanizmaları esas olarak *gyrA* ve *gyrB*'deki mutasyonlar ve mutasyonlar *gyrB*'de ilaç direncinde daha önemli bir rol oynamıştır (Feng ve ark., 2019). Bu çalışmada toplam 30 izolattan 29'unda *gyrB* geninin varlığı belirlenmiştir. *gyrB* geni 222 bp büyüklüğünde PCR ürünü elde edilmiştir. (Şekil 4.7, 4.8).



Şekil 4.7. *Pseudomonas aeruginosa* örneklerinin *gyrB* geninin amplifikasyon sonuçlarının %1.5 agaroz jel elektroforezi. Eth.Br M: 100bp, Agarose, LE, Analytical Grade, Promega ABD.



Şekil 4.8. *Pseudomonas aeruginosa* örneklerinin *gyrB* geninin amplifikasyon sonuçlarının %1.5 agaroz jel elektroforezi. Eth.Br M: 100bp, Agarose, LE, Analytical Grade, Promega ABD.

P. aeruginosa, çeşitli enfeksiyöz sendromlara neden olan önde gelen bir nozokomiyal patojen olan, çevrede her yerde bulunan Gram negatif bir bakteridir. Farklı

çalışmalarda hastane kaynaklı enfeksiyonların %8-25'inden *P. aeruginosa* sorumlu tutulmuştur. Bu bakteri sıklıkla hastanelerdeki nemli ortamlardan ve hasta tedavisinde kullanılan alet ve sıvılardan izole edilmekte ve özellikle yoğun bakım üniteleri ve nütropenik hastaların takip edildiği üniteler için daha da önem kazanmaktadır (Nordmann ve Guibert, 1998; Aydın ve ark., 2000). *P. aeruginosa* yüksek mortaliteye sahip klinik tablolara neden olur (Carmeli ve ark., 1999; Karadenizli ve ark., 2002).

P. aeruginosa'nın neden olduğu ciddi enfeksiyonların tedavisi, günümüzde yaygın olan çoklu antibiyotik direnci nedeniyle sorun teşkil etmektedir. *Pseudomonas* enfeksiyonlarında antimikrobiyal ajanlara karşı direncin hızlı gelişimi ve yüksek prevalansı ciddi bir sorundur (Nordmann ve Guibert, 1998; Aydın ve ark., 2000). *P. aeruginosa* insanlarda farklı koşullar altında farklı anatomik bölgelerde fırsatçı enfeksiyonlara neden olur. Bakterilerin çeşitli virölans faktörlerine ek olarak, konakçı hücre yanıtının da enfeksiyon gelişiminde önemli rol oynadığı bilinmektedir. Bu virölans faktörleri arasında kirpikler, pilus, LPS, aljinat, piyosiyanın, pyoverdin, proteaz, elastaz, fosfolipaz C, *ekzoA*, rhamnolipid ve biyofilm bulunmaktadır (Feldman ve ark., 1998; Fonseca ve Sousa, 2007; Karatuna ve Yağcı, 2008). Fırsatçı bir patojen olan *P. aeruginosa*, entübe hastalarda ventilatörle ilişkili ciddi pnömonilerde rol oynamaktadır. Üst solunum yollarında *P. aeruginosa* kolonizasyonu ve endotrakeal entübasyon süresi bu hastalarda pnömoni oluşumu ile ilişkilidir. *P. aeruginosa*'nın hareketsiz veya cansız yüzeylerde kolonize olması için bakterilerin geniş bir yüzeyde büyümesi gerekir. Bu durum biyofilm oluşumu ile ortaya çıkmaktadır (Favre-Bonté ve ark., 2003). *P. aeruginosa*, patojenitesine katkıda bulunan çeşitli virölans faktörlerine sahiptir. Bu nedenle, yüksek doğruluk ve özgüllük ile hızlı tespit, bu patojenik bakterinin kontrolünde çok önemlidir (Buhl ve ark., 2015).

Hücreler arası iletişime dayalı popölasyon yoğunluğuna dayalı iletişim mekanizmasına Q.S sistemi denir ve birçok bakteri türünde görölmektedir. Bakteriler arasındaki bu iletişimin temeli, bakterilerin otostimölator (AI) sinyal molekülleri adı verilen bazı maddeleri bulundukları ortama sentezlemeleri ve bu sentezlenen maddelerin yoğunluğunu ve ortamdaki popölasyon yoğunluklarını tespit edebilmeleri ve bunun sonucunda sinyal moleküllerinin özel genlerin ifadesinde rol oynamasıdır. Bakteriler bu şekilde yüzlerce toplu davranış sergilerler ancak bunlardan en önemlisi bulaşıcı hastalıkların kaynağı olan virölans faktörlerinin sentezidir. *P. aeruginosa*'nın virölans

mekanizması da sinyal moleküllerinin üretimi doğrultusunda Q.S sistemi tarafından kontrol edilmektedir. Bu sebeple *P. aeruginosa* suşlarında bu sinyal moleküllerinin üretimi virülans faktörlerinin üretilmesi ve dolayısıyla patojenitenin oluşturulmasında önem göstermektedir (McKnight ve ark., 2000; Gallagher ve ark., 2002). Bu yüzden bakterileri doğrudan öldürmek yerine, virülans faktörlerinin üretiminden sorumlu olan bakteriyel iletişim sisteminin Q.S inhibitör bileşikleriyle engellenmesi, bakteriyel enfeksiyonların tedavi veya kontrolünün sağlanması, patojenik mikroorganizmalarla mücadelede umut verici yeni bir strateji olarak değerlendirilmektedir (Bosgelmez-Tınaz, 2013).

Q.S inhibitörleri, *P. aeruginosa*'nın artan antibiyotik direnci sorununun üstesinden gelmek için kullanılabilecek alternatif terapötikler olarak en çok çalışılan ajanlardır. Bu inhibitörlere ayrıca mikroorganizmanın virülansını hedefleyen antipatojenik ilaçlar da denilir. *P. aeruginosa*'nın öldürücülüğü, hücre-hücre iletişim sistemine veya bakterilerin artan hücre yoğunluğu nedeniyle koordineli yanıtlar üretmesine izin veren çözünür sinyal moleküllerini kullanan Q.S sistemine dayanmaktadır. Yoğun araştırmalar, bakteriler, algler ve bitkiler dahil olmak üzere çeşitli kaynaklardan çok sayıda Q.S inhibitörünün tanımlanmasına yol açmıştır (Rasmussen ve diğerleri, 2005). Bu inhibitör moleküllerin proteaz, pyoverdin, kitinaz gibi *P. aeruginosa* virülans faktörlerinin üretimi, kayma hareketi ve biyofilm oluşumu üzerinde etkisi olduğu ancak çoğunun insan kullanımına pek uygun olmadığı belirlenmiştir. çünkü tolere edilebilir dozlarda ya toksiktirler ya da etki göstermezler (Bosgelmez-Tınaz, 2007).

Antibiyotiğe dirençli patojenik bakteriler, hastane enfeksiyonlarına yol açan ve hastanede yatan hastalarda morbidite ve mortalite oranlarını artıran büyük bir küresel sorun olmaya başlamıştır (Saeed ve ark., 2018). Dünya Sağlık Örgütü'nün 2017 yılında yapılan çalışmalar sonucunda yayınladığı rapora göre, yeni antibiyotiklere acilen ihtiyaç olduğunu belirtmişlerdir (Tacconelli ve ark., 2018; Horcajada ve ark., 2019). Bakterilerin patojenitesine katkıda bulunan bu genlerin prevalansının periyodik olarak belirlenmesidir. Özellikle *lasR*, *lasI* genlerinin yayılma mekanizmasının anlaşılmasında ve dirençli izolatların takibinde tedavide önemli rol oynamaktadır. Ayrıca QS genlerinin biyofilm oluşumu ve MDR ilaç grubuna karşı direncin belirlenmesi de büyük önem taşımaktadır.

Yapılan bu çalışma ile ağırlıklı olarak atık halde olmak üzere farklı kaynaklardan izole edilen *P. aeruginosa* izolatlarının öncelikle Q.S sistem genlerine bakılmıştır. Araştırmaya katılan 30 örneğin 29'sun da *lasI*, *lasR* genlerinin hepsi mevcutken 1 örnekte *lasR* geni negatif bulunmuştur. Bazı araştırmalar, *lasR-lasI* sisteminin genlerindeki mutasyonların piyosiyenin üretiminde azalmaya neden olduğunu ortaya koymuştur (McKnight ve ark., 2000; Gallagher ve ark., 2002).

Çalışmada *lasR* geni negatif olan 29'suncu nolu örneğin piyosiyenin pigmenti üretmediği bu çalışmaları destekler niteliktedir. Setrimide agar'ın *P. aeruginosa* için bir deterjan görevi gördüğü ve diğer birçok organizmanın büyümesini engellediği bilinmektedir ve setrimidin (%0,03) varlığında büyüme kapasitesini belirlemek için kullanılan seçici ve diferansiyel bir ara maddedir, bu sonuçlar Tang (2014) ile tutarlıdır (Tang ve ark., 2014).

Biyofilm oluşumunun *P.aeruginosa* enfeksiyonlarının patogeneğinde önemli rol oynadığı belirlenmiştir. Biyofilm enfeksiyonlarının çok yaygın olması nedeniyle biyofilm direncini yol açmasına yönelik çalışmalar önem taşımaktadır (Maurice ve ark., 2018) . Bu çalışmada Çoklu ilaç direnci (MDR) gösteren tüm 30 izolatın hepsinde (%100'de) biyofilm oluşumu görülmüştür buda Shatti ve arkadaşlarının 2022'de yaptıkları çalışma sonuçları ile tutarlıdır (Shatti ve ark., 2022).

Wang ve arkadaşları tarafından 2005 yılında yapılan bir çalışmada 12 otopatojen *P. aeruginosa* suşunun biyofilm seviyeleri kristal viyole kullanılarak mikrotitre plak yöntemi ile ölçülmüş ve suşlar PAO-1'in biyofilm seviyelerine göre karşılaştırılmıştır. Çalışma sonucunda 12 suştan 10'unun PAO-1'den 2-18 kat daha güçlü biyofilm ürettiği, diğer 2 suşun ise PAO-1'e yakın veya daha düşük biyofilm oluşturduğu saptanmıştır Bu sonuçlar bizim çalışmamızda tam tersini göstermiştir (Wang ve ark., 2005).

P.aeruginosa enfeksiyonunun tedavisinde kullanılan CIP direnci ve bir beta-laktamaz inhibitörü antibiyotik olan PRP direnci ile ilgili literatürde birçok yayın bulmak mümkündür (del Barrio-Tofiño ve ark., 2017; Pokharel ve ark., 2019).

Erdal ve arkadaşlarının 2020'de yaptıkları klinik *P. aeruginosa* suşlarının Siproflaksasin ve Pipresaslin / Tazobaktam antibiyotiklerinin (Sub – MİK)

konsatrasyonlarının biyofilm yapımı üzere etkilerinin incelediği çalışmada bu tez sonuçlarının aksine biyofilm oluşturan suşlarında daha düşük oranda Pipresaslin / Tazobaktam 37.5 % oranında direnç olduğu tesbit edilirken Siproflaksasine düşük direnç görüldü ve bu sonuçlar bu çalışmaya uyumlu olduğunu göstermiştir (Erdal ve ark., 2021).

Antibiyotik direnç oranları ile ilgili yapılan çeşitli çalışmalarda *P. aeruginosa*'nın en duyarlı olduğu antibiyotikler imipenem, meropenem ve daha düşük oranlarda da olsa amikasin; Sefalosporinlerin daha dirençli olduğunu bildirilmiş olması direnç oranlarının bu tez çalışmasının sonuçları ile uyumlu olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda duyarlılık testleri sonuçlarına göre amikasin en düşük direnci göstererek bu çalışma ile uyumlu olduğunu gösterirken, imipenem ve meropenem antibiyotikleri tüm izolatlarda direnç göstererek bu tez çalışması ile uyumlu olmadığını göstermiştir (Hoşaf ve ark.; Elaldi ve ark., 2003).

Başka bir çalışmada 8 farklı hastaneden toplanan ve nozokomiyal enfeksiyonlara neden olan 162 *P. aeruginosa* suşunun mikrotiter plak yöntemi ile biyofilm üretimi ve antibiyotik direnç oranları disk difüzyon yöntemi ile karşılaştırılmıştır. Çalışmada bu suşlar biyofilm seviyelerine göre biyofilm oluşturan ve oluşturmayanlar olarak iki gruba ayrıldı. Antibiyotik direnç oranlarına bakıldığında her iki grubun amikasin, gentamisin ve seftriaksona benzer, siprofloksasine ise daha düşük direnç gösterdiği görüldü. Aynı çalışma sonucunda biyofilm oluşturan grubun antibiyotiklere karşı daha dirençli olduğu ve tedavisi daha zor enfeksiyonlara yol açtığı belirtilmektedir (Delissalde ve Amábile-Cuevas, 2004).

Biyofilm içerisindeki bakterilerin antibiyotiklere direncini sağlayan çeşitli faktörler vardır. Bunlar arasında yavaş büyüme, biyofilm tabanındaki oksijen içeriğinin azalması, pozitif yüklü aminoglikozitlerin negatif yüklü aljinat polimerlerine bağlanmasıyla oluşan penetrasyon bariyeri ve bakterilerde beta-laktamazların varlığı yer alır. Standart duyarlılık testleri kullanılan antibiyotiklere duyarlı olduklarını gösterse de biyofilmdeki bakterilerde artan direnç çoğu zaman tedavilerinde başarısızlığa yol açmaktadır (Anwar ve ark., 1992).

P. aeruginosa'nın hücre dışı virülans faktörlerinin çoğunun üretiminin kontrolü, hücreden hücreye sinyalleşme, bakteriler arası iletişim ve bakteri hücre yoğunluğunun

gözlendiği mekanizmalar yoluyla gerçekleşir. Bakteriler arasındaki iletişimde kullanılan dil, mikroorganizmaların çevreye saldıkları sinyal moleküllerinden oluşur. Bakteriler ürettikleri sinyal moleküllerinin yoğunluğunu ölçerek çevrelerindeki diğer mikroorganizmaların miktarını algılayabilirler. QS adı verilen bu sistem virülansla önemlidir (De Kievit ve Iglewski, 2000; Taga ve Bassler, 2003).

P. aeruginosa'nın ekzoproteaz, siderofor, ekzotoksin ve lipaz gibi virülans faktörlerinin çoğu QS tarafından düzenlenir. QS ile virülans faktörlerinin kontrolü, *P. aeruginosa*'ya çeşitli avantajlar sağlar. QS sistemi, yeterli bakteri yoğunluğuna ulaşıldıktan sonra hücre dışı virülans faktörlerinin üretimini sağlar (Rumbaugh ve ark., 2004).

Genetik çalışmalar, *P. aeruginosa*'da iki farklı QS sistemi tanımlamıştır. Bu sistemlerin her birinde R ve I genleri arasında Las R-I ve Rhl R-I olarak adlandırılan bir bağlantı vardır. LasR sistemi, transkripsiyonel düzenleme sonucunda LasI aracılı genel bir sinyal molekülü olan 3-O-C12-HSL'yi serbest bırakırken, RhlR sistemi, RhlI aracılı genel sinyal molekülü C4-HSL'yi serbest bırakır. transkripsiyon düzenlemesi (Duan ve Surette, 2007).

P. aeruginosa'da, bazal seviyede düşük hücre yoğunluğunda LasI aracılı 3-O-C12-HSL üretimi de vardır. Hücre yoğunluğunun artması ile sinyal molekülü kritik konsantrasyona ulaşır ve LasR aktivasyonu gerçekleşir. LasR-3-O-C12-HSL kompleksi, virülans genlerinin transkripsiyonunu aktive eder. Bu genler aktive olur *lasB*, *toxA*, *rhlR* ve *lasI* genlerini içerir. LasI'nin LasR tarafından etkinleştirilmesi, pozitif bir oto-düzenleme döngüsü oluşturur. QS düzenleyici kaskatta LasR aracılığı ile RhlR'nin aktivasyonu gerçekleşir. Sonuç olarak Rhl sisteminin aktivasyonu için Las sistem aktivasyonu gereklidir. RhlI aracılı C4-HSL salımı RhlR aktivasyonu sağlar. RhlR aktivasyonu, hidrojen siyanür ve piyosiyanın gibi çeşitli sekonder metabolitlerin üretimi için gerekli genlerin ekspresyonunu sağlar. *P. aeruginosa*'daki QS mekanizmasının elemanlarındaki mutasyon, bu bakterilerin laboratuvar koşullarında büyümesini önemli ölçüde etkilemez. PAO-1 suşu ile LasI ve RhlI sistemlerinde mutasyon bulunan *P. aeruginosa* suşlarında aynı laboratuvar koşullarında benzer üreme oranları saptanmıştır (Parsek ve Greenberg, 2000).

QS'nin *P. aeruginosa* patogenezine katkısı bugüne kadar literatürde yayınlanmış birçok çalışmada gösterilmiştir. Klinik çalışmalarda başta *P. aeruginosa* olmak üzere kistik fibrozis gibi kronik akciğer enfeksiyonu olan hastaların enfekte akciğer dokularında veya farklı enfekte dokularda QS'nin tamamen fonksiyonel olduğu bulunmuştur (Hentzer ve ark., 2003; Hooi ve ark., 2004; Rumbaugh ve ark., 2004; Schaber ve ark., 2004; Singh ve Greenstein, 2006).

Bu çalışmada QS'de rol alan *lasI*, *lasR* genlerinin varlıkları PCR yöntemi kullanılarak incelendi. Bunun için bu genlerin içinde değişik bölgelere uyan ve daha önce tasarlanmış oligonükleotid primerleri kullanıldı (Schaber ve ark., 2004).

Bu çalışmada da PAO-1'e göre zayıf biyofilm yapan 26 nolu izolat QS gen kaybı saptanmamıştır. Bu sonuca göre biyofilm yapımının sadece QS gen varlığına bağlı olmadığı, gerek transkripsiyonel faktörlerin, gerekse çoğalma ortamındaki diğer çevresel faktörlerin biyofilme gidişte etkili olduğu düşünülmüştür.

Schaber ve ark. PAO-1'in QS gen defekti olan 5 klinik izolatta tespit edildiğini bildirmiştir. Başka bir çalışmada biyofilm üretim hızlarını ve büyüme özelliklerini yeniden değerlendirdi. Yedi gün boyunca biyofilm kalınlıklarının ve yoğunluklarının kaydedildiği çalışmada, gen kusurlu tüm suşlarda erkek biyofilm aşamasında ve yüzeye tutunma aşamasında PAO-1'e göre daha zayıf bir etki gözlemlendi. Öte yandan, daha önceki çalışmalarında *lasR* ve *rhlR* gen kaybı saptadıkları, düşük *lasI* ve *rhlI* gen seviyelerine sahip 2 suşun, benzer kalınlıkta ancak sonunda PAO-1'den daha geç olgun biyofilmler oluşturduğu gözlemlenmiştir. 7. günün PAO-1'e göre biraz daha yüksek *lasI* ve *rhlI* gen seviyelerine sahip diğer 2 suşta daha ince ve heterojen bir olgun biyofilm gözlenirken, PAO-1'e en yüksek ve en yakın gen seviyelerine sahip suş, PAO-1 ile benzer kalınlıkta ve daha fazla heterojenliğe sahiplenmiştir. Biyofilm oluşturduğu belirlenmiştir. PAO-1'e göre bu suşların *lasI* seviyeleri %37-71 iken, *rhlI* seviyeleri %35-92 olarak bulunmuştur. *lasR* ve *rhlR* gen kaybını saptadıkları suşların biyofilm yapısının PAO-1'e göre daha az farklılaşmasından yola çıkarak, *lasR* ve *rhlR* genlerinin biyofilm farklılaşmasında rol oynadığını belirtmişlerdir. PAO-1'in QS gen kusurlu suşlarla büyüme özellikleri dikkate alındığında, büyümenin hiçbir aşamasında fark bulunmadı. Çalışmadaki suşların flagella ve pilus bağımlı hareket özelliklerinde PAO-1'e göre zayıf olduğu tespit edildi. Çalışma sonucunda kamçıya bağlı seğirme, pilusa bağlı oğul hareketi ve QS sistemlerinin

biyofilm oluşumunda etkili mekanizmalar olduğu belirtildi. QS'nin tek başına biyofilmin başlamasında önemli bir rol oynamadığı, ancak olgun biyofilmlerin üretilmesinde daha etkili olduğu sonucuna varılmıştır (Schaber ve ark., 2007).

Biyofilmler çok sayıda subakut ve kronik enfeksiyonla ilişkilendirilmiştir (Boisvert ve ark., 2016). *P. aeruginosa*, aljinat adı verilen bir ekzopolisakarit sentezler, bakterileri değişen çevre koşullarından korur ve katı yüzeylere yapışmayı teşvik eder (Dhaife ve Al-Attar, 2021). Alginat biyosentetik genlerinin (*algD* geni) transkripsiyonu, substratuma bağlanma ile indüklenir ve bu, biyofilm oluşumuna yol açan artan alginat üretimine yol açar (Russell ve ark., 2004).

Namuq ve ark 2019 da Irak'ta bir çalışmada *P. aeruginosa*'da *algD* geni ile biyofilm oluşumu arasındaki ilişkinin incelendiği çalışmada, *algD* geninin tüm biyofilm oluşturunucularda yüksek oranda mevcut olduğu bulunmuştur (Namuq ve ark., 2019). bu, bakterilerin biyofilm üretmesinin tek nedeninin yalnızca QS genlerinin varlığı olmadığı anlamına gelmektedir.

Irak'ta 2012'de yapılan başka bir çalışmadaysa klinik *P. aeruginosa* suşlarının duyarlılık testi sonuçları bu tez çalışmanın aksini göstermiştir. Çalışma sonucuna göre amikasin %14.3 düşük direnc gösterirken ampislin antibiyotigin diren oranı bu çalışmaya uyumlu olduğu görülmüştür (kreem Al-salamy ve Al-Hilli, 2012). Irak'ta 2022' de yapılan diğer çalışmada tüm MDR ve biyofilm üreten *P. aeruginosa* izolatları QS genleri olan *lasI*, *lasR* %100 saptanması bu tez çalışması aksine 30 izolattan nolu 26 suş MDR ve biyofilm üretmesine rağmen QS genleri görülmemiştir bu buda bu çalışma sonuçlarına göre uyumlu olmadığını göstermiştir (Mohammed ve Zgair, 2022).

Çinde 2019 da yapılan bir çalışmada, CIP'nin suşları in vitro seçime dirençli hale getirme konusunda LEV'den daha güçlü olduğu görülmüştür. FQ'ların *P. aeruginosa*'ya karşı moleküler direnç mekanizmaları temel olarak *gyrA* ve *gyrB*'deki mutasyonlardır ve *gyrB*'deki mutasyonlar ilaç direncinde daha önemli bir rol oynamıştır buda bizim çalışmamızın sonuçlarına uyumlu değildir (Feng ve ark., 2019).

Sonuç olarak, Irak toplumunda genetik mutasyonların ve antibiyotik direncinin varlığının en önemli nedenlerinden biri, Iraklı bireylerin çoğunluğunun ayırım

gözetmeden ve doğrudan tedaviye başvurmadan önce bir doktora danışmadan veya ilaç duyarlılığını kontrol etmeden antibiyotik kullanmasıdır. Ayrıca Irak hastanelerinde uygulanan dezenfeksiyon sistemleri, enfeksiyona neden olan mikroorganizmalara, özellikle *P. aeruginosa* ve farklı virülans faktörlerine sahip diğer benzer bakterilere karşı genel olarak etkisi yeterli değildir. Dolayısıyla bu bakteriler hastanede uzun süre kalan hastalar için büyük risk oluşturmaktadır.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1 Sonuçlar

- 1) Bu çalışmada, Kerkük hastanelerinden atık halde bulunan farklı kaynaklardan elde edilen toplam 125 *Pseudomonas* spp örneğinden 50 klinik *P. aeruginosa* bakteri izolatu gösterildi.
- 2) Bu çalışmada kullanılan biyofilmlerin kantitatif analizi sonucunda 47 *P. aeruginosa* izolatından 46'sı (%97,8) farklı şiddette biyofilm üretti, 1'i (%2,2) üretmedi. Ayrıca farklı şiddette biyofilm üreten izolatların sonuçları %10.6'nın şiddetli, %23.4'nin orta şiddetli ve %63.8'nin zayıf şiddetli biyofilm ürettiği gözlemlenmiştir.
- 3) 30 adet *P. aeruginosa* izolatının beta-laktamazlar, aminoglikozidler, florokinolon/kinolon, polimiksin grubu antibiyotikleri içeren toplam 37 adet antibiyotik duyarlılık testi sonucunda tüm izolatlar çoklu antibiyotik direnci göstermiştir. Toplam 30 izolattan 18'i (%60) 31 antibiyotiğe %100 direnç gösterirken, 12'si (%40) nispeten daha düşük direnç gösterdi ve en düşük direnç antibiyotik amikasin %70 dirençliydi.
- 4) Çoklu ilaç direnci gösteren tüm 30 izolatın hepsinde (%100'de) biyofilm oluşumu görülmüştür. Toplam 30 izolattan 18'i (% 60) 31 antibiyotiğe % 100 direnç gösteren izolatların 1'si (% 3.3 'ünün) Şiddetli biyofilm , 1 (% 3.3) Orta Şiddetli Biyofilm oluşturan izolatlar ve 16 (% 53.4) Zayıf Biyofilm oluşturan izolatlar belirlenmiştir.

- 5) Toplam 30 MDR izolattan 29'unda *gyrB* geninin varlığı belirlenmiştir.
- 6) QS genleri, *P. aeruginosa* izolatlarında saptanmıştır. Buradaki sonuçlar 30 adet izolatta 29 *lasI*, *lasR* genlerinin bulunduğunu göstermiştir.
- 7) *lasI* ve *lasR* genleri pozitif olan 29 izolattan 3'ünde şiddetli biyofilm, 2'sinde orta derecede biyofilm ve 24'ünde zayıf biyofilm gözlemlendi. Ek olarak, 26. suş %80 MDR ve zayıf biyofilm üretmesine rağmen, *lasI*, *lasR*, *gyrB* genleri negatifti.
- 8) Bu çalışma antibiyotiğe dirençli bakteriler ve Q.S sistemi ile biyofilm oluşturan suşların hızlı tesbiti ile etkili tedaviye sağladığı katkıyı göstermek açısından önem arz etmektedir.

5.2 Öneriler

Bu çalışmanın sonuçlarının sonraki çalışmalar için bir literatür kaynağı oluşturacağı düşüncesindeyiz. Ayrıca bu çalışma; çoklu antibiyotiğe dirençli bakteriler ve Q.S sistemi ile biyofilm oluşturan suşların hızlı tesbiti ile etkili tedaviye sağladığı katkıyı göstermek açısından önem arz etmektedir.

VITEK-2 raporuna göre, aşırı Amp-c enzim üretimi, beta-laktamlara, özellikle karbapenem grubu antibiyotiklere dirençli *P. aeruginosa* izolatlarından kaynaklanabilir, bu nedenle gelecek çalışmalarda ampC geninin tanımlanması önemlidir.

P. aeruginosa'nın, özellikle hastanelerde, yayılmasını kontrol etmek ve önlemek amacıyla salgınları takip etmek ve izlemek için programların geliştirilmesinde,

P. aeruginosa'nın neden olduğu bakteriyel enfeksiyonlara karşı hangi antibiyotiğin daha fazla etkili olduğunu belirlemek için ülke hastanelerinde kapsamlı ve periyodik antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılması hususunda gelecekte yapılacak araştırmalar için bir ön hazırlık niteliğindedir.

KAYNAKLAR

- Al-Qasi, L., 2012, Purification, characterization and genetic evaluation of Phenazine produced by *Pseudomonas aeruginosa* local isolates, *Degree of Doctorate. College of Science, University of Baghdad*.
- Al-Wrafiy, F., Brzozowska, E., Górska, S. ve Gamian, A., 2017, Pathogenic factors of *Pseudomonas aeruginosa*—the role of biofilm in pathogenicity and as a target for phage therapy, *Advances in Hygiene and Experimental Medicine*, 71, 78-91.
- An, Y., Bhagwat, S., Bokranz, W., Bradshaw, D., Brown, M., Burne, R., Chen, Y., de Kievit, T., Friedman, R. ve Gerstel, U., 2003, Medical Implications of Biofilms, Cambridge University Press.
- Anuj, S. N., Whiley, D. M., Kidd, T. J., Bell, S. C., Wainwright, C. E., Nissen, M. D. ve Sloots, T. P., 2009, Identification of *Pseudomonas aeruginosa* By a Duplex Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay Targeting The *ecfx* And The *gyrb* Genes, *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 63 (2), 127-131.
- Anwar, H., Strap, J., Chen, K. ve Costerton, J., 1992, Dynamic interactions of biofilms of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* with tobramycin and piperacillin, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 36 (6), 1208-1214.
- Aydın, K., Çaylan, R., Köksal, İ., Volkan, S. ve Öksüz, R., 2000, *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının yıllara göre antibiyotik duyarlılığı, *Hastane İnfek Derg*, 4, 92-96.
- Baron, S., Fons, M. ve Albrecht, T., 1996, Viral pathogenesis, *Medical Microbiology. 4th edition*.
- Bassetti, M., Vena, A., Croxatto, A., Righi, E. ve Guery, B., 2018, How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections, *Drugs in context*, 7.
- Baştürk, S., 2005, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* Suşlarında Çeşitli Kinolon Grubu Antibiyotiklerin Duyarlılıklarının Araştırılması, *Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Uzmanlık Tezi*, 88s.
- Bayse, C., Cullinane, M., Denervaud, V., Burrowes, E., Dow, J. M., Morrissey, J. P., Tam, L., Trevors, J. T. ve O'Gara, F., 2005, Modulation of Quorum Sensing In *Pseudomonas aeruginosa* Through Alteration of Membrane Properties, *Microbiology*, 151 (8), 2529-2542.

- Ben Haj Khalifa, A., Moissenet, D., Vu Thien, H. ve Khedher, M., 2011, [Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and modes of regulation], *Annales de biologie clinique*, 69 (4), 393-403.
- Benz, R. ve Hancock, R. E., 1981, Properties of the large ion-permeable pores formed from protein F of *Pseudomonas aeruginosa* in lipid bilayer membranes, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 646 (2), 298-308.
- Boisvert, A.-A., Cheng, M. P., Sheppard, D. C. ve Nguyen, D., 2016, Microbial biofilms in pulmonary and critical care diseases, *Annals of the American Thoracic Society*, 13 (9), 1615-1623.
- Boyd, A. ve Chakrabarty, A., 1995, *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: role of the alginate exopolysaccharide, *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, 15 (3), 162-168.
- Brown, J. H., 1939, *Bergey's manual of determinative bacteriology*, American Public Health Association.
- Buhl, M., Peter, S. ve Willmann, M., 2015, Prevalence and risk factors associated with colonization and infection of extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: a systematic review, *Expert review of anti-infective therapy*, 13 (9), 1159-1170.
- Cabot, G., Zamorano, L., Moyà, B., Juan, C., Navas, A., Blázquez, J. ve Oliver, A., 2016, Evolution of *Pseudomonas aeruginosa* antimicrobial resistance and fitness under low and high mutation rates, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 60 (3), 1767-1778.
- Caldwell, C. C., Chen, Y., Goetzmann, H. S., Hao, Y., Borchers, M. T., Hassett, D. J., Young, L. R., Mavrodi, D., Thomashow, L. ve Lau, G. W., 2009, *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin Pyocyanin Causes Cystic Fibrosis Airway Pathogenesis, *The American journal of pathology*, 175 (6), 2473-2488.
- Cao, H., Krishnan, G., Goumnerov, B., Tsongalis, J., Tompkins, R. ve Rahme, L. G., 2001, A Quorum Sensing-Associated Virulence Gene of *Pseudomonas aeruginosa* Encodes A Lysr-Like Transcription Regulator With a Unique Self-Regulatory Mechanism, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98 (25), 14613-14618.
- Carmeli, Y., Troillet, N., Eliopoulos, G. M. ve Samore, M. H., 1999, Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of risks associated

- with different antipseudomonal agents, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 43 (6), 1379-1382.
- Coşkun, U. ve Coşkun, G., 2013, Klinik Örneklerden İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Antibiyotik Direnç Durumunun Belirlenmesi, *Flora*, 18 (4), 175-180.
- Costerton, J., Montanaro, L. ve Arciola, C. R., 2005, Biofilm in implant infections: its production and regulation, *The International journal of artificial organs*, 28 (11), 1062-1068.
- Dash, M., Padhi, S., Narasimham, M. V. ve Pattnaik, S., 2014, Antimicrobial resistance pattern of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from various clinical samples in a tertiary care hospital, South Odisha, India, *Saudi Journal for Health Sciences*, 3 (1), 15.
- Davane, M., Suryawanshi, N., Pichare, A. ve Nagoba, B. S., 2014, *Pseudomonas aeruginosa* from hospital environment, *Journal of Microbiology and Infectious Diseases*, 4 (01).
- Davies, D., 2003, Understanding biofilm resistance to antibacterial agents, *Nature reviews Drug discovery*, 2 (2), 114-122.
- Davies, D. G., Parsek, M. R., Pearson, J. P., Iglewski, B. H., Costerton, J. W. ve Greenberg, E. P., 1998, The Involvement of Cell-To-Cell Signals in The Development of a Bacterial Biofilm, *Science*, 280 (5361), 295-298.
- de Abreu, P. M., Farias, P. G., Paiva, G. S., Almeida, A. M. ve Moraes, P. V., 2014, Persistence of microbial communities including *Pseudomonas aeruginosa* in a hospital environment: a potential health hazard, *BMC microbiology*, 14 (1), 1-10.
- De Kievit, T. R. ve Iglewski, B. H., 2000, Bacterial Quorum Sensing in Pathogenic Relationships, *Infection and immunity*, 68 (9), 4839-4849.
- del Barrio-Tofiño, E., López-Causapé, C., Cabot, G., Rivera, A., Benito, N., Segura, C., Montero, M. M., Sorlí, L., Tubau, F. ve Gómez-Zorrilla, S., 2017, Genomics and susceptibility profiles of extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Spain, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61 (11), e01589-01517.
- Delissalde, F. ve Amábile-Cuevas, C. F., 2004, Comparison of antibiotic susceptibility and plasmid content, between biofilm producing and non-producing clinical

- isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *International journal of antimicrobial agents*, 24 (4), 405-408.
- Dhaife, S. S. ve Al-Attar, N. S., 2021, EFFECT OF PRODIGIOSIN ON BIOFILM FORMATION IN CLINICAL ISOLATES OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*, *Plant Archives*, 21 (1), 826-834.
- do Nascimento, L. C. G. B., Junior, G. L. A., Pereira, V. M., da Silva Rodrigues, G., da Silva Junior, A. B., Lemos, A. L. C., de Souza Santos, R. V. ve do Nascimento, A. B., 2022, Resistência bacteriana no tratamento de pneumonia em pacientes de unidades hospitalares: uma revisão sistemática, *Research, Society and Development*, 11 (13), e25111334930-e25111334930.
- Domingo-Calap, P., Georgel, P. ve Bahram, S., 2016, Back to the future: bacteriophages as promising therapeutic tools, *Hla*, 87 (3), 133-140.
- Donabedian, H., 2003, Quorum sensing and its relevance to infectious diseases, *Journal of infection*, 46 (4), 207-214.
- Dong, Y.-H. ve Zhang, L.-H., 2005, Quorum sensing and quorum-quenching enzymes, *The Journal of Microbiology*, 43 (1), 101-109.
- Donlan, R. M., 2001, Biofilms And Device-Associated Infections, *Emerging infectious diseases*, 7 (2), 277.
- Donlan, R. M., 2002, Biofilms: microbial life on surfaces, *Emerging infectious diseases*, 8 (9), 881.
- Drlica, K., Malik, M., Kerns, R. J. ve Zhao, X., 2008, Quinolone-mediated bacterial death, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52 (2), 385-392.
- Duan, K. ve Surette, M. G., 2007, Environmental regulation of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Las and Rhl quorum-sensing systems, *Journal of bacteriology*, 189 (13), 4827-4836.
- Düzgün, D., 2009, Değişik kaynaklardan izole edilen *pseudomonas aeruginosa* suşlarının virulans faktörleri, biyofilm formasyonu ve quorum sensing yönünden değerlendirilmesi, *Bursa Uludag University (Turkey)*.
- Elaldi, N., Turan, M., Duran, B., Bakır, M., Dökmetaş, İ. ve Bakıcı, M., 2003, Bir üniversite hastanesinde nozokomiyal üriner sistem infeksiyonları: etken mikroorganizmalar ve antimikrobiyal direnç, *CÜ Tıp Fakültesi Derg*, 25 (2), 63-68.
- Erdal, B., Yalinay, M. ve Elmas, Ç., 2021, Piperasilin/Tazobaktam ve Siprofloksasin Sub-minimal İnhibitör Konsantrasyonlarında *Pseudomonas aeruginosa* Biyofilm

Oluşumunun ve Quorum Sensing Genlerinin Araştırılması, *Mikrobiyoloji Bulteni*.

- Favre-Bonté, S., Köhler, T. ve Van Delden, C., 2003, Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*: role of the C4-HSL cell-to-cell signal and inhibition by azithromycin, *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 52 (4), 598-604.
- Feldman, M., Bryan, R., Rajan, S., Scheffler, L., Brunnert, S., Tang, H. ve Prince, A., 1998, Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection, *Infection and immunity*, 66 (1), 43-51.
- Feng, X., Zhang, Z., Li, X., Song, Y., Kang, J., Yin, D., Gao, Y., Shi, N. ve Duan, J., 2019, Mutations in *gyrB* play an important role in ciprofloxacin-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, *Infection and Drug Resistance*, 261-272.
- FIROUZI, D. L., Pooladi, M., Nowroozi, J., AKHVAN, S. A. ve Hooshiyar, M., 2016, Presence of *exoU* and *exoS* genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from urinary tract infections.
- Fonseca, A. ve Sousa, J., 2007, Effect of shear stress on growth, adhesion and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* with antibiotic-induced morphological changes, *International journal of antimicrobial agents*, 30 (3), 236-241.
- Frimmersdorf, E., Horatzek, S., Pelnikevich, A., Wiehlmann, L. ve Schomburg, D., 2010, How *Pseudomonas aeruginosa* adapts to various environments: a metabolomic approach, *Environmental microbiology*, 12 (6), 1734-1747.
- Gallagher, L. A., McKnight, S. L., Kuznetsova, M. S., Pesci, E. C. ve Manoil, C., 2002, Functions Required For Extracellular Quinolone Signaling By *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of bacteriology*, 184 (23), 6472-6480.
- Gambello, M. J., Kaye, S. ve Iglewski, B. H., 1993, *LasR* of *Pseudomonas aeruginosa* is a Transcriptional Activator of The Alkaline Protease Gene (*Apr*) And An Enhancer of Exotoxin a Expression, *Infection and immunity*, 61 (4), 1180-1184.
- Girard, G. ve Bloemberg, G. V., 2008, Central Role of Quorum Sensing in Regulating The Production of Pathogenicity Factors in *Pseudomonas aeruginosa*.
- Gorgani, N., Ahlbrand, S., Patterson, A. ve Pourmand, N., 2009, Detection of point mutations associated with antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*, *International journal of antimicrobial agents*, 34 (5), 414-418.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W. ve Stoodley, P., 2004, Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases, *Nature Reviews Microbiology*, 2 (2), 95-108.

- Harly, J. ve Prescott, L., 2002, Laboratory exercises microbiology. WCB, The McGraw-Hill, Inc., New York, USA.
- Hassan, A., Usman, J., Kaleem, F., Omair, M., Khalid, A. ve Iqbal, M., 2011, Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates, *Brazilian journal of infectious diseases*, 15, 305-311.
- Hentzer, M., Wu, H., Andersen, J. B., Riedel, K., Rasmussen, T. B., Bagge, N., Kumar, N., Schembri, M. A., Song, Z. ve Kristoffersen, P., 2003, Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors, *The EMBO journal*, 22 (15), 3803-3815.
- Heurlier, K., Dénervaud, V., Haenni, M., Guy, L., Krishnapillai, V. ve Haas, D., 2005, Quorum-Sensing-Negative (*LasR*) Mutants of *Pseudomonas aeruginosa* Avoid Cell Lysis And Death, *Journal of bacteriology*, 187 (14), 4875-4883.
- Hirsch, E. B. ve Tam, V. H., 2010, Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection on patient outcomes, *Expert review of pharmacoeconomics & outcomes research*, 10 (4), 441-451.
- Hoffman, L. R., Kulasekara, H. D., Emerson, J., Houston, L. S., Burns, J. L., Ramsey, B. W. ve Miller, S. I., 2009, *Pseudomonas aeruginosa LasR* Mutants Are Associated With Cystic Fibrosis Lung Disease Progression, *Journal of Cystic Fibrosis*, 8 (1), 66-70.
- Hooi, D. S., Bycroft, B. W., Chhabra, S. R., Williams, P. ve Pritchard, D. I., 2004, Differential immune modulatory activity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecules, *Infection and immunity*, 72 (11), 6463-6470.
- Horcajada, J. P., Montero, M., Oliver, A., Sorlí, L., Luque, S., Gómez-Zorrilla, S., Benito, N. ve Grau, S., 2019, Epidemiology And Treatment of Multidrug-Resistant And Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Infections, *Clinical microbiology reviews*, 32 (4), e00031-00019.
- Hoşaf, E., Çalica, A., Çetin, B. D. ve Seber, E., Yara, Abse ve Akıntı Örneklerinden Elde Edilen *Pseudomonas Aeruginosa* Suşlarının Antibiyotik Duyarlılıkları.
- JALAL, S. ve WRETLIND, B., 1998, Mechanisms of quinolone resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*, *Microbial Drug Resistance*, 4 (4), 257-261.
- Jedrey, H., Lilley, K. S. ve Welch, M., 2018, Ciprofloxacin binding to GyrA causes global changes in the proteome of *Pseudomonas aeruginosa*, *FEMS Microbiology Letters*, 365 (13), fny134.

- Joyanes, P., del Carmen Conejo, M. a., Martínez-Martínez, L. ve Perea, E. J., 2001, Evaluation of the VITEK 2 system for the identification and susceptibility testing of three species of nonfermenting gram-negative rods frequently isolated from clinical samples, *Journal of clinical microbiology*, 39 (9), 3247-3253.
- Kalurazi, T. Y., Nazari-Alam, A., Ebrahim-Saraie, H. S., Rostami, F. M., Yousefi, M., Delpasand, K. ve Halaji, M., 2021, Epidemiology of Antibiotic Resistance Pattern of *Pseudomonas Aeruginosa* in Cystic Fibrosis Patients in Iran: A Systematic Review and Meta-Analysis, *Gazi Medical Journal*, 32 (3).
- Karadenizli, A., Kolaylı, F., Gündeş, S. ve Ergen, K., 2002, *Pseudomonas aeruginosa*'nın tikarsilin-klavulanik aside duyarlılığının hastanede kullanıma girmeden ve kullanıma girdikten bir yıl sonraki değişiminin araştırılması, *Klinik Dergisi*, 15, 89-91.
- Karatuna, O. ve Yağcı, A., 2008, *Pseudomonas aeruginosa*'da virülans faktörleri ve quorum sensing, *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 38 (1), 42-51.
- Kerkeni, L., Ruano, P., Delgado, L., Picco, S., Villegas, L., Tonelli, F., Merlo, M., Rigau, J., Diaz, D. ve Masuelli, M., 2016, We Are IntechOpen, the World'S Leading Publisher of Open Access Books Built by Scientists, for Scientists TOP 1%, Intech, 2016.
- Khan, A. A. ve Cerniglia, C. E., 1994, Detection of *Pseudomonas aeruginosa* From Clinical And Environmental Samples By Amplification of The Exotoxin a Gene Using PCR, *Applied and environmental microbiology*, 60 (10), 3739-3745.
- Kingsley, S. J. ve Verghese, S., 2013, First Report of OXA-4, an ESBL isolated from *Pseudomonas aeruginosa* a South Indian Strain, *Indian journal of microbiology*, 53 (3), 308-314.
- Klockgether, J., Cramer, N., Wiehlmann, L., Davenport, C. F. ve Tümmler, B., 2011, *Pseudomonas aeruginosa* genomic structure and diversity, *Frontiers in microbiology*, 2, 150.
- kreem Al-salamy, A. ve Al-Hilli, E. S. A., 2012, Antibiotics Susceptibility pattern of *Pseudomonas aeruginosa* that isolated from ear, wound and urine samples, *journal of the college of basic education*, 18 (76).
- Lari, A. R., Azimi, L., Soroush, S. ve Taherikalani, M., 2015, Low prevalence of metallo-beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a tertiary burn care center in Tehran, *International journal of immunopathology and pharmacology*, 28 (3), 384-389.

- Lazdunski, A. M., Ventre, I. ve Sturgis, J. N., 2004, Regulatory Circuits And Communication in Gram-Negative Bacteria, *Nature Reviews Microbiology*, 2 (7), 581-592.
- Lee, D. G., Urbach, J. M., Wu, G., Liberati, N. T., Feinbaum, R. L., Miyata, S., Diggins, L. T., He, J., Saucier, M. ve Déziel, E., 2006, Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial, *Genome biology*, 7, 1-14.
- Lister, P. D., Wolter, D. J. ve Hanson, N. D., 2009, Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms, *Clinical microbiology reviews*, 22 (4), 582-610.
- Livermore, D. M., 2002, Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare?, *Clinical infectious diseases*, 34 (5), 634-640.
- Lyczak, J. B., Cannon, C. L. ve Pier, G. B., 2000, Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist, *Microbes and infection*, 2 (9), 1051-1060.
- March, J. C. ve Bentley, W. E., 2004, Quorum sensing and bacterial cross-talk in biotechnology, *Current opinion in biotechnology*, 15 (5), 495-502.
- Mathee, K., Narasimhan, G., Valdes, C., Qiu, X., Matewish, J. M., Koehrsen, M., Rokas, A., Yandava, C. N., Engels, R. ve Zeng, E., 2008, Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* genome evolution, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105 (8), 3100-3105.
- Maurice, N. M., Bedi, B. ve Sadikot, R. T., 2018, *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: host response and clinical implications in lung infections, *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 58 (4), 428-439.
- McKnight, S. L., Iglewski, B. H. ve Pesci, E. C., 2000, The *Pseudomonas* Quinolone Signal Regulates *rhl* Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of bacteriology*, 182 (10), 2702-2708.
- Moghaddam, M. M., Abolhassani, F., Babavalian, H., Mirnejad, R., Azizi Barjini, K. ve Amani, J., 2012, Comparison of in Vitro Antibacterial Activities of Two Cationic Peptides CM15 And CM11 Against Five Pathogenic Bacteria: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Acinetobacter baumannii*, and *Escherichia coli*, *Probiotics and antimicrobial proteins*, 4 (2), 133-139.

- Mohammed, H. A. ve Zgair, A. K., 2022, Detection of Quorum Sensing Genes of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Different Areas in Iraq, *Iraqi Journal of Science*, 4665-4673.
- Moore, N. M. ve Flaws, M. L., 2011, Introduction: *pseudomonas aeruginosa*, *Clinical laboratory science*, 24 (1), 41.
- Moradali, M. F., Ghods, S. ve Rehm, B. H., 2017, *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence, *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 39.
- Mouly, T. F., 2018, Detection of possible mutations in *gyrA* gene of ciprofloxacin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with lung infection, *BRAC University*.
- Nakano, K., Terabayashi, Y., Shiroma, A., Shimoji, M., Tamotsu, H., Ashimine, N., Ohki, S., Shinzato, M., Teruya, K. ve Satou, K., 2015, First complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter 1872) Migula 1900 (DSM 50071T), determined using PacBio single-molecule real-time technology, *Genome announcements*, 3 (4), e00932-00915.
- Nakasone, I., Kinjo, T., Yamane, N., Kisanuki, K. ve Shiohira, C. M., 2007, Laboratory-based evaluation of the colorimetric VITEK-2 Compact system for species identification and of the Advanced Expert System for detection of antimicrobial resistances: VITEK-2 Compact system identification and antimicrobial susceptibility testing, *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 58 (2), 191-198.
- Namuq, A. O., Ali, K. O. M. ve Al-Ani, A. H., 2019, Correlation between biofilm formation, multi-drug resistance and *AlgD* gene among *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates, *Journal of University of Babylon for Pure and Applied Sciences*, 27 (3), 143-150.
- Neuhauser, M. M., Weinstein, R. A., Rydman, R., Danziger, L. H., Karam, G. ve Quinn, J. P., 2003, Antibiotic resistance among gram-negative bacilli in US intensive care units: implications for fluoroquinolone use, *Jama*, 289 (7), 885-888.
- Nguyen, K., Nguyen, T., Nguyen, H. ve Le, D., 2018a, Mutations in the *gyrA*, *parC*, and *mexR* genes provide functional insights into the fluoroquinolone-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated in Vietnam, *Infection and Drug Resistance*, 11, 275-282.

- Nguyen, L., Garcia, J., Gruenberg, K. ve MacDougall, C., 2018b, Multidrug-resistant *Pseudomonas* infections: hard to treat, but hope on the horizon?, *Current infectious disease reports*, 20, 1-10.
- Nordmann, P. ve Guibert, M., 1998, Extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*, *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 42 (2), 128-131.
- Nouraldin, A. A. M., Baddour, M. M., Harfoush, R. A. H. ve Essa, S. A. M., 2016, Bacteriophage-antibiotic synergism to control planktonic and biofilm producing clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Alexandria Journal of Medicine*, 52 (2), 99–105-199–105.
- Nouri, R., Ahangarzadeh Rezaee, M., Hasani, A., Aghazadeh, M. ve Asgharzadeh, M., 2016, The role of *gyrA* and *parC* mutations in fluoroquinolones-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Iran, *brazilian journal of microbiology*, 47, 925-930.
- Novick, R. P. ve Muir, T. W., 1999, Virulence gene regulation by peptides in staphylococci and other Gram-positive bacteria, *Current opinion in microbiology*, 2 (1), 40-45.
- Önem, E. ve Ulusoy, S., 2018, *Pseudomonas aeruginosa* Klinik İzolatlarında Virülans Faktörlerinin Araştırılması ve İzolatlar Arasındaki Klonal İlişkinin Pulsed Field Jel Elektroforez Yöntemiyle Belirlenmesi.
- Parsek, M. R. ve Greenberg, E. P., 2000, Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97 (16), 8789-8793.
- Pearson, J. P., Feldman, M., Iglewski, B. H. ve Prince, A., 2000, *Pseudomonas aeruginosa* Cell-to-Cell Signaling is Required For Virulence in a Model of Acute Pulmonary Infection, *Infection and immunity*, 68 (7), 4331-4334.
- Pérez-Pérez, M., Jorge, P., Pérez Rodríguez, G., Pereira, M. O. ve Lourenço, A., 2017, Quorum sensing inhibition in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: new insights through network mining, *Biofouling*, 33 (2), 128-142.
- Pesci, E. C., Milbank, J. B., Pearson, J. P., McKnight, S., Kende, A. S., Greenberg, E. P. ve Iglewski, B. H., 1999, Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96 (20), 11229-11234.

- Pincus, D. H., 2006, Microbial identification using the bioMérieux Vitek® 2 system, *Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods*. Bethesda, MD: Parenteral Drug Association, 2006, 1-32.
- Pokharel, K., Dawadi, B. R., Bhatt, C. P. ve Gupte, S., 2019, Prevalence of pseudomonas aeruginosa and its antibiotic sensitivity pattern, *Journal of Nepal Health Research Council*, 17 (1), 109-113.
- Pollack, M., 1990, Pseudomonas aeruginosa, *Principles and practice of infectious diseases*, 1673-1691.
- Poole, K., 2001, Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in Pseudomonas aeruginosa and related organisms, *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 3 (2), 255-264.
- Post, J. C., Stoodley, P., Hall–Stoodley, L. ve Ehrlich, G. D., 2004, The role of biofilms in otolaryngologic infections, *Current opinion in otolaryngology & head and neck surgery*, 12 (3), 185-190.
- Qin, X., Emerson, J., Stapp, J., Stapp, L., Abe, P. ve Burns, J. L., 2003, Use of Real-Time PCR With Multiple Targets to Identify *Pseudomonas aeruginosa* And Other Nonfermenting Gram-Negative Bacilli From Patients With Cystic Fibrosis, *Journal of clinical microbiology*, 41 (9), 4312-4317.
- Rasamiravaka, T., Labtani, Q., Duez, P. ve El Jaziri, M., 2015, The formation of biofilms by Pseudomonas aeruginosa: a review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms, *BioMed research international*, 2015.
- Ruby, E. G., 1996, Lessons from a cooperative, bacterial-animal association: the Vibrio fischeri–Euprymna scolopes light organ symbiosis, *Annual review of microbiology*, 50 (1), 591-624.
- Rumbaugh, K. P., Hamood, A. N. ve Griswold, J. A., 2004, Cytokine induction by the P. aeruginosa quorum sensing system during thermal injury, *Journal of Surgical Research*, 116 (1), 137-144.
- Russell, H., Hugo, W. ve Fraiese, A., 2004, Ayliffe's Principles and Practice of Disinfection, *Preservation & Sterilization*.
- Saeed, M., Rasheed, F., Afzal, R. K., Hussain, S., Riaz, S. ve Ahmad, A., 2018, Pseudomonas aeruginosa: Evaluation of pathogen burden and drug-resistance trends in a tertiary care hospital, *J Coll Physicians Surg Pak*, 28 (4), 279-283.

- Şahin, R., 2007, Staphylococcus aureus suşlarında biyofilm üretimi, biyofilm pozitif ve negatif suşların genotipik ve fenotipik karakterlerinin karşılaştırılması.
- Sana'a, N. H., 2013, Detection of Exo A and OPR I genes in Pseudomonas aeruginosa using polymerase chain reaction, *Iraqi Journal of Biotechnology*, 12 (1), 44-50.
- Sawa, T., Ohara, M., Kurahashi, K., Twining, S. S., Frank, D. W., Doroques, D. B., Long, T., Gropper, M. A. ve Wiener-Kronish, J. P., 1998, In Vitro Cellular Toxicity Predicts *Pseudomonas aeruginosa* Virulence in Lung Infections, *Infection and immunity*, 66 (7), 3242-3249.
- Schaber, J. A., Carty, N. L., McDonald, N. A., Graham, E. D., Cheluvappa, R., Griswold, J. A. ve Hamood, A. N., 2004, Analysis of Quorum Sensing-Deficient Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of medical microbiology*, 53 (9), 841-853.
- Schaber, J. A., Hammond, A., Carty, N. L., Williams, S. C., Colmer-Hamood, J. A., Burrowes, B. H., Dhevan, V., Griswold, J. A. ve Hamood, A. N., 2007, Diversity of biofilms produced by quorum-sensing-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of medical microbiology*, 56 (6), 738-748.
- Senturk, S., Ulusoy, S., Bosgelmez-Tinaz, G. ve Yagci, A., 2012, Quorum Sensing And Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* During Urinary Tract Infections, *The Journal of Infection in Developing Countries*, 6 (06), 501-507.
- Shariati, A., Azimi, T., Ardebili, A., Chirani, A., Bahramian, A., Pormohammad, A., Sadredinamin, M., Erfanimanesh, S., Bostanghadiri, N. ve Shams, S., 2018, Insertional inactivation of oprD in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients in Tehran, Iran, *New microbes and new infections*, 21, 75-80.
- Shatti, H. H., Al-Saeed, W. M. ve Nader, M. I., 2022, Effect Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa* Resistance To Antibiotic, *Mustansiriya Medical Journal*, 21 (1), 14.
- Shrout, J. D., Chopp, D. L., Just, C. L., Hentzer, M., Givskov, M. ve Parsek, M. R., 2006, The impact of quorum sensing and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is nutritionally conditional, *Molecular microbiology*, 62 (5), 1264-1277.
- Shunmugaperumal, T., 2010, Biofilm eradication and prevention: a pharmaceutical approach to medical device infections, John Wiley & Sons, p.

- Singh, M. P. ve Greenstein, M., 2006, A simple, rapid, sensitive method detecting homoserine lactone (HSL)-related compounds in microbial extracts, *Journal of microbiological methods*, 65 (1), 32-37.
- SIRIKEN, B. ve Veli, Ö., 2017, *Pseudomonas aeruginosa*: özellikleri ve quorum sensing mekanizması, *Gıda ve Yem Bilimi Teknolojisi Dergisi* (18), 42-52.
- Smith, R. S. ve Iglewski, B. H., 2003, *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing as a Potential Antimicrobial Target, *The Journal of clinical investigation*, 112 (10), 1460-1465.
- Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A., Mizoguchi, S., Warrenner, P., Hickey, M., Brinkman, F., Hufnagle, W., Kowalik, D. ve Lagrou, M., 2000, Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen, *Nature*, 406 (6799), 959-964.
- Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., Pulcini, C., Kahlmeter, G., Kluytmans, J. ve Carmeli, Y., 2018, Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis, *The Lancet infectious diseases*, 18 (3), 318-327.
- Taga, M. E. ve Bassler, B. L., 2003, Chemical communication among bacteria, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100 (suppl_2), 14549-14554.
- Tang, Y.-W., Liu, D., Sussman, M., Poxton, I. ve Schwartzman, J., 2014, Molecular medical microbiology, Academic press, p.
- Tormo, M. a. A. n., Martí, M., Valle, J., Manna, A. C., Cheung, A. L., Lasa, I. ve Penadés, J. R., 2005, SarA is an essential positive regulator of *Staphylococcus epidermidis* biofilm development, *Journal of bacteriology*, 187 (7), 2348-2356.
- Uzunbayır-Akel, N., Tekintaş, Y., Yılmaz, F. F., Öztürk, İ., Okeer, M., Aydemir, S. Ş., Çilli, F. F. ve Hoşgör-Limoncu, M., 2019, Klinik *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarının Virülans Özellikleri Ve Epidemiyolojik İlişkisi, *Türk Hijyen ve Deneyisel Biyoloji Dergisi*, 76 (4), 395-404.
- Van Delden, C. ve Iglewski, B. H., 1998, Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections, *Emerging infectious diseases*, 4 (4), 551.
- Vandepitte, J., Verhaegen, J., Engbaek, K., Piot, P., Heuck, C. C., Rohner, P. ve Heuck, C., 2003, Basic laboratory procedures in clinical bacteriology, World Health Organization, p.

- Wagner, V. E. ve Iglewski, B. H., 2008, *P. aeruginosa* Biofilms in Cf Infection, *Clinical reviews in allergy & immunology*, 35 (3), 124-134.
- Wang, E. W., Jung, J. Y., Pashia, M. E., Nason, R., Scholnick, S. ve Chole, R. A., 2005, Otopathogenic *Pseudomonas aeruginosa* strains as competent biofilm formers, *Archives of Otolaryngology-Head & Neck Surgery*, 131 (11), 983-989.
- Wang, Y., Dai, Y., Zhang, Y., Hu, Y., Yang, B. ve Chen, S., 2007, Effects of Quorum Sensing Autoinducer Degradation Gene on Virulence And Biofilm Formation of *Pseudomonas aeruginosa*, *Science in China Series C: Life Sciences*, 50 (3), 385-391.
- Woods, D. E., 2004, Comparative genomic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* virulence, *Trends in microbiology*, 12 (10), 437-439.
- Yetkin, G., Otlu, B., Cicek, A., Kuzucu, C. ve Durmaz, R., 2006, Clinical, Microbiologic, And Epidemiologic Characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* Infections in A University Hospital, Malatya, Turkey, *American journal of infection control*, 34 (4), 188-192.
- Zhapouni, A., Farshad, S. ve Alborzi, A., 2009, *Pseudomonas aeruginosa*: burn infection, treatment and antibacterial resistance.

EKLER

EK-1 VİTEK-2 Rapuru

VITEK® 2 Advanced Expert System™ Library Report

Resistance Mechanism	HL CASE + R CARBAPENEMS (IMPER)
Drug Family	BETA-LACTAMS
Bacteria Name	Pseudomonas aeruginosa
Resistance Mechanism Definition	Chromosomally encoded AmpC overproduction that contributes to carbapenem resistance if accompanied by additional resistance mechanisms such as efflux pump overproduction (MexA-MexB-OprM) or decreased D2 porin. The overproduction of the AmpC can occur by induction of the ampC gene or through a process of derepression, leading to constitutive high-level expression.
Typical Antibiogram and Phenotypic Characteristics	The overproduction of cephalosporinase leads to resistance to all beta-lactams except carbapenems. The enzyme activity is not inhibited by the inhibitors of penicillinases (clavulanic acid, tazobactam...) The permeability default leads to resistance to imipenem and or meropenem.
Resistance Spectrum	Very Broad
Transmissibility	Unlikely to be associated with an outbreak
References (PMID)	Lister P.D. Antibacterial-resistant Pseudomonas aeruginosa: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. Clin. Microbiol. Rev. (2009) 22(4):582-610 PMID: 19822890 Livermore D.M. Of Pseudomonas, porins, pumps and carbapenems. Antimicrob. Chemother. (2001) 47: 247-250. PMID: 11222556

EK-2 VİTEK-2 sonuçları örneği

Patient Name: 8, .		Patient ID: ehjesw	
Location:		Physician:	
Lab ID: 128		Isolate Number: 1	
Organism Quantity:			
Selected Organism : Pseudomonas aeruginosa			
Source:		Collected:	
Comments:			
Susceptibility Information		Analysis Time: 8.10 hours	
		Status: Final	
Antimicrobial	MIC	Interpretation	Antimicrobial
+Amoxicillin		R	+Cefmenoxim
+Ampicillin		R	+Cefotaxime
+Amoxicillin/Clavulanic Acid		R	+Cefovecin
+Ampicillin/Sulbactam		R	Ceftazidime
+Carbenicillin		R	+Ceftiofur
Ticarcillin	>= 128	R	+Ceftizoxime
Ticarcillin/Clavulanic Acid	64	S	+Ceftriaxone
+Azlocillin		R	+Cefoperazone/Sulbactam
Piperacillin	>= 128	R	+Ceftazidime/Avibactam
+Piperacillin/Sulbactam			+Ceftolozane/Tazobactam
Piperacillin/Tazobactam	>= 128	R	Cefepime
+Cefsulodin		R	+Cefozopran
+Ceftaroline		R	+Cefpirome
+Ceftobiprole		R	Aztreonam
+Cefaclor		R	+Doripenem
+Cefadroxil		R	Imipenem
+Cefalexin		R	Meropenem
+Cefalotin		R	Amikacin
+Cefazolin		R	Gentamicin
+Cefradine		R	+Netilmicin
+Cefamandole		R	Tobramycin
+Cefotiam		R	+Cinoxacin
+Cefuroxime		R	Ciprofloxacin
+Cefmetazole		R	+Levofloxacin
+Cefotetan		R	Pefloxacin
+Cefoxitin		R	Minocycline
+Cefcapene		R	Colistin
+Cefdinir		R	Rifampicin
+Cefditoren		R	Trimethoprim/Sulfamethoxazole
+Cefixime		R	
*== AES modified **== User modified			
AES Findings			
Confidence:		Consistent	

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : ALI HUSSEIN BHA ALDAN ALTURKI
Uyruğu : ERKEK

EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	: ELVelit lisesi - IRAK - KERKÜK	2022
Üniversite	: Kerkük Teknik Koleji - IRAK - KERKÜK	2006
Yüksek Lisans	: Selçuk Üniversite-Fen bilimleri-Biyoloji	2023
Doktora	:	

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
2009	Azadi Hastanesi	Laborant
2010	Dibis Köy Sağlık Merkezi	Laborant
2011	Kerkük Sağlık Merkezi	Müfetiş
2013	Teahi Sağlık Merkezi	Laborant
2015	Kerkük Genel Hastanesi	Laborant

UZMANLIK ALANI

Tibbi Laborant

YABANCI DİLLER

İngilizce, Türkçe

BELİRTMEK İSTEĞİNİZ DİĞER ÖZELLİKLER

YAYINLAR